

BEITRÄGE

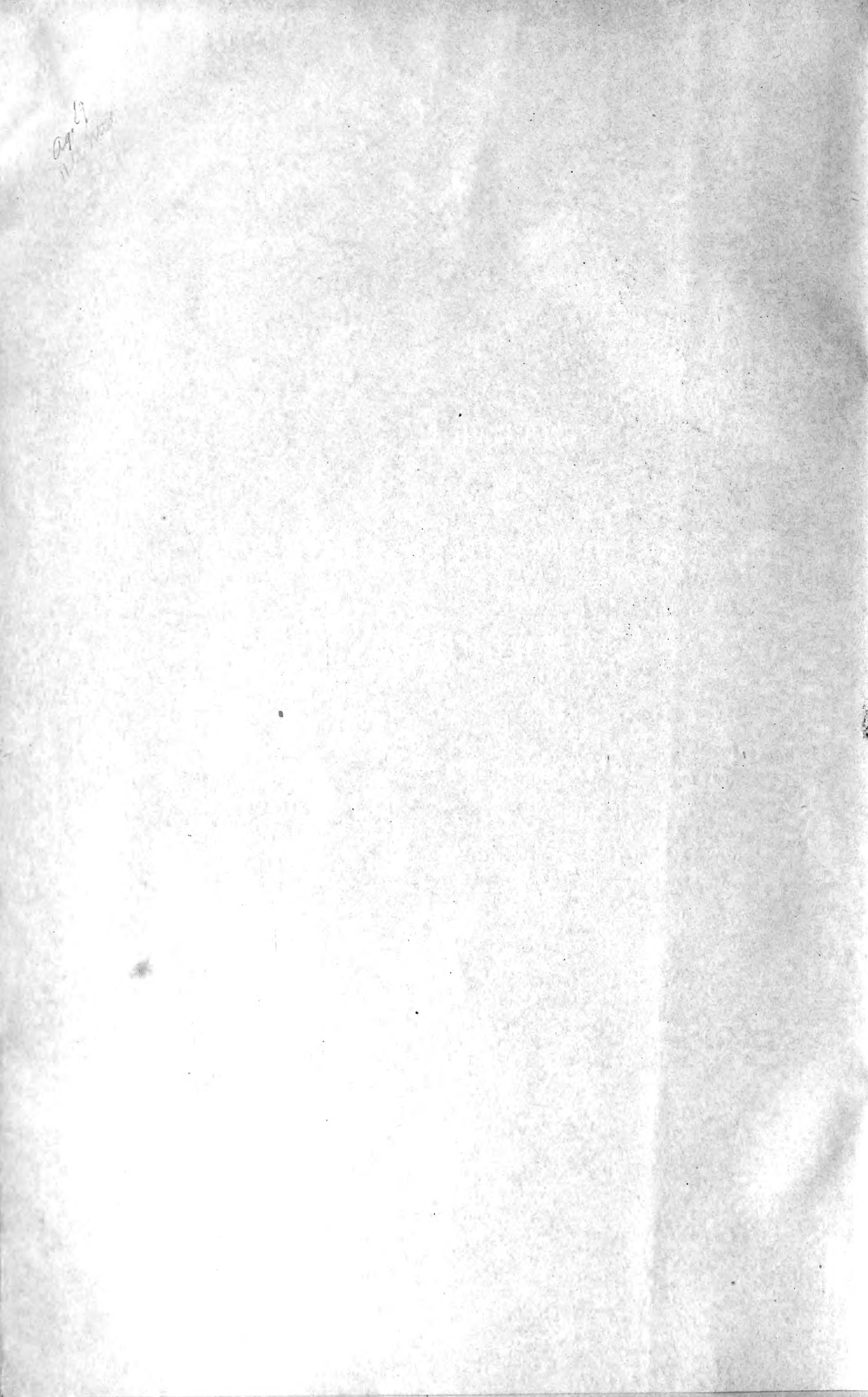
ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

SIEBENTER BAND



BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

SIEBENTER BAND

MIT IN DEN TEXT GEDRUCKTEN ABBILDUNGEN UND EINER LICHTDRUCKTAFEL

BRAUNSCHWEIG

VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1906

INHALT.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

1 5) ! ;

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

VII. Band. 1., 2. u. 3. Heft
(Ausgegeben August 1905)

Braunschweig
Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1905.

Inhalt des 1., 2. u. 3. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

1905

I.

Zur Kenntnis der Katalasen.*)

Von **Hans Euler.**

O. Loew**) hat — zunächst auf Grund eigener Versuche mit Auszügen aus Tabaksblättern — (1901) den für das weitere Studium der Enzymwirkungen wichtigen Schluß gezogen, daß die Fähigkeit pflanzlicher und tierischer Extrakte, Wasserstoffperoxyd zu zersetzen, auf der Anwesenheit eines besonderen Enzyms — der Katalase — beruht. Diese Fähigkeit ist von O. Loew selbst und auch von anderen Forschern***) an einer großen Zahl pflanzlicher Organe nachgewiesen worden. Katalasen tierischen Ursprungs haben Jakobson†), Senter††), Kastle und Loevenhart†††), Kobert*†), Liebermann**†), Batelli***†) und seine Mitarbeiter, Rosenbaum†*), Raudnitz††*), Reiss†††*) und Faitelowitz§) untersucht. Von allen ist nach Loew die Katalase als selbständiges Enzym anerkannt worden.

Daß Blutfibrin kräftig zersetzend auf Wasserstoffsuperoxyd wirkt, ist seit Thénard bekannt, und später fand Schönbein,

---

*) Zum Teil in Svenska Vet. Akad. Ark. f. Kemi **1**, 357 (1904) mitgeteilt.

**) Catalase, Rep. U. S. Departement of Agric. Washington (1901).

***) Bach und Chodat, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 1275 und 2466; **36**, 1756 (1903). Liebermann, Pflügers Archiv **104**, 176 (1904). Issajew, Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 102 (1904). N. Wender, Chem. Centralbl. 1284 (1904).

†) Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 340 (1891).

††) Zeitschr. f. physik. Chemie **44**, 257 (1903) und Proc. Roy. Soc. **74**, 201 (1904).

†††) Amer. Chem. Journ. **29**, 563 (1903).

*†) Pflügers Archiv **99**, 116 (1903).

†) Pflügers Archiv **104, 203 (1904).

***†) C. r. Soc. Biol. **57**, 264 u. 375; **58**, 21 u. C. r. **138**, 923 (1904).

†*) Festschrift f. Salkowski.

††*) Centralblatt f. Physiol. 1898, 790.

†††*) Zeitschr. f. klin. Med. **56**.

§) Inaug.-Diss. Heidelberg 1904.

daß auch defibriniertes Blut die gleiche Eigenschaft besitzt. Bergengrün*) stellte fest, daß das Blut verschiedener Tiere in dieser Hinsicht ungleichen Wirkungsgrad besitzt. Schönbeins Auffassung, daß die Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, allen Enzymen neben ihren spezifischen Wirkungen eigen sei, wurde durch Versuche von J. Jakobson**) erschüttert, welcher fand, daß auf dreierlei Weise die wasserstoffsuperoxydspaltende Kraft verschiedener Enzyme zerstört werden kann, ohne daß zugleich die spezifische Wirkung geschädigt wird, nämlich durch Erhitzen der gelösten und trockenen Enzyme auf bestimmte Temperaturen, durch Erschöpfung ihrer wasserstoffsuperoxydspaltenden Kraft und durch Aussalzen mit Natriumsulfat.

Loew hat (loc. cit.) die Aufgabe besprochen, welche möglicherweise den Katalasen im pflanzlichen Organismus zufällt. Er erinnert an die stark giftige Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf Bakterien und schreibt:

„Therefore, since the oxidation in the respiration process would take a detrimental turn if hydrogen peroxid accumulated as a by-product, the role of the catalase may possibly be explained. It would destroy every trace of this poisonous substance as quickly as it were formed and would thus afford an important protection. The oxygen set free by this destructive operation could at once be utilized again for the continuance of the respiration process.“

Die Frage, ob die wasserstoffsuperoxydzersetzenden Enzyme, die „Katalasen“ verschiedener Herkunft, identisch sind, ist für die Beurteilung der Funktion dieser weit verbreiteten Enzyme von Bedeutung.

Die folgende Mitteilung soll zur Kenntnis der Wirkungsweise und der biologischen Aufgabe der „Katalasen“ beitragen.

Katalase aus Boletus scaber.

Die wirksamsten Lösungen pflanzlicher Katalasen werden aus Pilzen gewonnen. Ich habe als erstes Versuchsmaterial den Preßsaft von Boletus scaber gewählt. Dieser in Mittelschweden häufig vorkommende Pilz war im Herbst 1904 in ziemlich reich-

*) Inaug.-Diss. Dorpat 1888. Über die katalytische Wirkung des Blutes vgl. ferner: Schmidt, Pflügers Archiv **6**, 413 (1872). Goldstein, Virchows Arch. **133**, 295. Raudnitz, Zeitschr. f. Biologie **42**, 92. W. Spitzer, Pflügers Archiv **67**, 615 (1897). Cotton, Bull. Soc. Chim. **25**, 255 (1901) und Ville u. Moitessier, Bull. Soc. Chim. **27**, 1003 (1902). A. Jolles, Münch. med. Woch. Nr. 7 (1904).

**) loc. cit.

licher Menge vorhanden. Er wurde in frischem Zustand in Portionen von ½ bis 2 kg an einem Reibeisen verrieben und sogleich mit 1 bis 2 Teilen Wasser gut verrührt. Die sich sofort violett färbende Masse wurde koliert, wobei ein ziemlich dickflüssiger Saft von neutraler Reaktion erhalten wurde. Es kam mir zunächst darauf an, die Eigenschaften des unveränderten Saftes kennen zu lernen. Zu diesem Zweck wurden Versuche angestellt über die Geschwindigkeit, mit welcher Wasserstoffsuperoxyd durch den verdünnten Boletussaft zersetzt wird.

Es wurde bei diesen Versuchen die Menge des zu einer gewissen Zeit noch vorhandenen Wasserstoffsuperoxyds durch Titration mit 0,01-normalem Kaliumpermanganat gemessen. Diese Methode ist, wie schon Bredig bei seinen Untersuchungen mit Wasserstoffsuperoxyd gefunden hat, der volumetrischen Bestimmung des entwickelten Sauerstoffs vorzuziehen. Es entsprechen sich dabei 2 Mol. Permanganat und 5 Mol. Wasserstoffsuperoxyd.

In den folgenden Tabellen ist neben der Zeit in Minuten die Anzahl verbrauchter Kubikzentimeter der 0,01 normalen Permanganatlösung angegeben. Die gefundenen Resultate sind, wo sich dies mit Sicherheit ausführen ließ, der leichteren Übersicht halber graphisch interpoliert. Die erste Titration nach dem Zusatz des Saftes entspricht der Zeit 0. Die unter K angegebenen Werte sind Reaktionskonstanten 1. Ordnung, nach der Formel $K = 0{,}4343\ k_1 = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ berechnet und zwar mit dekadischen Logarithmen.

1.

In Rücksicht auf O. Loews unlösliche Katalase wurde zunächst untersucht, ob der frisch kolierte Saft durch Filtration in seiner Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd erheblich geschwächt wird. Versuchstemperatur 15°.

a) Es wurden 20 ccm des kolierten Saftes auf 200 ccm verdünnt. Von dieser Lösung wurden 5 ccm in 100 ccm einer ungefähr $^1/_{20}$-normalen Wasserstoffsuperoxydlösung pipettiert.

b) Der gleiche Versuch wurde mit dem vorher durch Filtrierpapier filtrierten Saft angestellt.

c) Kontrollversuch ohne Saft.

a			b			c	
Min.	ccm	K	Min.	ccm	K	Min.	ccm
0	7,5	—	0	7,5	—	0	7,5
3	4,7	0,0677	3	5,5	0,0449	7	7,5
5	3,4	0,0686	5	4,5	0,0445	12	7,5
7	2,6	0,0660	7	3,8	0,0422	30	7,4
12	1,4	—					

Vergleicht man die Versuche a und b mit c, so sieht man, daß eine erhebliche Schwächung des frischen Saftes durch Filtration nicht eintritt. Es wäre nach Loew hieraus zu schließen, daß den bei der Filtration zurückbleibenden Teilen wenig Katalase anhaftet.

2.

Die nächsten Versuche galten der Haltbarkeit des mit wenig Chloroform versetzten Saftes, und zwar ist die Versuchslösung

a) etwa 1/2 Stunde nach Extraktion der Pilze bereitet,
b) nach etwa 6 Stunden,
c) nach etwa 26 Stunden.

	a			b			c	
Min.	ccm	K	Min.	ccm	K	Min.	ccm	K
0	7,8	—	0	7,8	—	0	7,8	—
2	5,8	0,0644	2	6,0	0,0569	2	6,2	0,0498
4	4,2	0,0672	4	4,5	0,0597	4	4,6	0,0575
8	2,5	0,0618	8	2,7	0,0576	8	2,9	0,0537

Der in einer verschlossenen Flasche aufbewahrte Saft behält also seine katalytische Wirksamkeit während eines Tages so gut wie unverändert bei. Die Haltbarkeit des Saftes hängt übrigens in hohem Grade von der Bereitung ab; besonders ist durch feine Verteilung zu bewirken, daß die Extraktion nicht zu lange Zeit in Anspruch nimmt, andernfalls färbt sich der Saft bald braun und wird unwirksam.

3.

Versuche zur Feststellung der Reaktionskinetik und der Konzentrationsfunktion haben folgende Ergebnisse geliefert:

1. Erreicht die Konzentration des katalysierenden Enzyms im Verhältnis zur Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds eine gewisse Größe, so wird das Wasserstoffsuperoxyd ziemlich genau nach der Reaktionsgleichung $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ zersetzt. Siehe Versuche a bis c. Bei niedrigerer Konzentration des katalysierenden Enzyms wird dieses Reaktionsgesetz scheinbar nicht mehr befolgt, sondern die Reaktionskoeffizienten K nehmen mit der Zeit stark ab. Eine derartige Abhängigkeit von der relativen Konzentration des Enzyms und des Peroxyds zeigte sich auch bei der Milchkatalase. Faitelowitz**) fand, daß nur bei Enzymüberschuß die Reaktion annähernd nach dem Zeitgesetz erster Ordnung verläuft. Je verdünnter die Wasserstoffsuperoxydlösung ist, in desto verdünnterer

*) Oxydases et reductases, Paris 1902, S. 99.
**) Dissertation, Heidelberg 1904.

Lösung der Boletus-Katalase bewährt sich noch die Gültigkeit der obigen Reaktionsgleichung.

Zu den folgenden Versuchen wurden 4 ccm Saft mit destilliertem Wasser auf 200 ccm verdünnt. Von dieser Lösung wurden 3, 4 und 5 ccm (Versuch a, b und c) in 100 ccm einer ungefähr $^1/_{20}$-normalen Wasserstoffsuperoxydlösung pipettiert.

Versuchstemperatur 15°.

	a			b			c	
Min.	ccm	K	Min.	ccm	K	Min.	ccm	K
0	8,0	—	0	8,0	—	0	8,2	—
6	6,9	0,0107	8	6,2	0,0138	2	7,5	0,0193
12	5,8	0,0116	10	5,6	0,0154	7	6,0	0,0193
19	5,0	0,0107	13	5,1	0,0150	16	4,0	0,0195
55	2,5	0,0100	19	4,2	0,0147	22	4,1	0,0190
		0,0107			0,0147			0,0193

2. Aus den vorstehenden Werten 0,0107, 0,0147 und 0,0193 ergibt sich, daß auch innerhalb der Grenzen für die Gültigkeit der Reaktionsgleichung 1. Ordnung der Reaktionskoeffizient K schneller als die Konzentration der Katalase wächst. Es entspricht dieses Resultat dem von Bredig und Müller von Berneck an kolloidalen Platinflüssigkeiten gefundenen. Auf die Reproduzierbarkeit der obigen Werte wird gleich eingegangen werden.

Loew hat gefunden, daß die Wirkung seiner aus Tabak extrahierten Katalasen schon durch verdünnte schwache Säuren stark geschwächt wird. Es war dies bei meinen Versuchen in noch höherem Grade der Fall. Wurden nämlich 4 ccm Saft statt mit destilliertem Wasser mit 0,002 normaler Essigsäure auf 200 ccm verdünnt und darauf, wie oben, 5 ccm dieser Lösung in 100 ccm $^1/_{20}$-normaler Wasserstoffsuperoxydlösung pipettiert, so ergab sich eine Konstante, welche nur wenig größer war als diejenige der reinen Superoxydlösung. Die katalysierende Wirkung des Boletussaftes wird demnach von verdünnten schwachen Säuren noch viel mehr geschwächt als diejenige des Tabakssaftes, der Blutkatalaselösungen (Senter) und der Lösungen der Hefekatalase (Issajew).

Ob die Verzögerung, welche durch Einleiten von Kohlensäure in den Boletussaft hervorgerufen wird, als eine Säurewirkung anzusehen ist, kann ich noch nicht entscheiden.

Durch einen Zusatz von frisch gefälltem feuchten Magnesiumhydroxyd wird die Wirkung der Katalase fast augenblicklich vergrößert. Wird dem im Verhältnis 1 : 200 verdünnten Saft feuchtes $Mg(OH)_2$ zugesetzt und die Lösung 5 Minuten darauf weiter verdünnt, so ergibt sich mit $^1/_{20}$-normalem Wasserstoffsuperoxyd

eine Reaktionskonstante K = 0,016 gegen K = 0,007 des ohne $Mg(OH)_2$ angestellten Kontrollversuchs.

Nach 2 Tagen zeigte sich, daß die Haltbarkeit des mit $Mg(OH)_2$ versetzten verdünnten Saftes noch etwas größer ist als diejenige der reinen Saftlösung.

Mit $Mg(OH)_2$	Ohne $Mg(OH)_2$
K = 0,0150.	K = 0,0050.

Dieses Ergebnis steht in qualitativer Übereinstimmung mit demjenigen von Loew. Dagegen vermindern Zusätze von $Ba(OH)_2$ auch in sehr kleinen Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeiten bei Blutkatalase und Fettkatalase. Vgl. S. 11 u. f.

Schließlich sei noch eine Überschlagsrechnung über den absoluten Wert der katalytischen Saftwirkung mitgeteilt.

Die Reproduzierbarkeit eines Saftes von der gleichen Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd ist auffallend. So wurde der Boletus an drei verschiedenen Tagen einer Woche gesammelt und jedesmal wenige Stunden darauf in der oben beschriebenen Weise extrahiert. Die drei verschiedenen Saftpräparate ergaben im Verhältnis 1:200 verdünnt mit $^1/_{20}$-normalem Wasserstoffsuperoxyd die folgenden Reaktionskonstanten bei 15°:

$$0{,}4343\ k_1 = \begin{cases} 0{,}067 & \text{I.} \\ 0{,}072 & \text{II.} \\ 0{,}048 & \text{III.} \end{cases}$$

Es wurden 10 ccm des Saftes (I) mit überschüssigem Ammoniumsulfat behandelt, wonach angenommen werden kann, daß die Eiweißsubstanzen einschließlich der Enzyme ziemlich vollständig gefällt wurden. Die bei 100° getrocknete Fällung betrug 0,055 g, der Liter Saft enthielt somit 5,5 g trockene Eiweißsubstanzen. Unter der sicher nicht zutreffenden Voraussetzung, daß diese ganze Menge aus aktiven Wasserstoffsuperoxydkatalysatoren (Katalasen) besteht, berechnet sich der Maximalgehalt der untersuchten verdünnten Lösung zu $\frac{5{,}5}{1500} = 0{,}004$ g pro Liter. Zufolge der für die Lösung ermittelten Reaktionskonstanten $0{,}4343\ k_1 = 0{,}0107$ (15°), übt die angegebene Eiweiß-(Enzym)-Menge ungefähr die gleiche katalytische Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd aus, wie kolloidales Platin in der Verdünnung 0,006 g pro Liter. (Bredig und Müller von Berneck loc. cit. S. 291.) Es entsprechen sich also in bezug auf katalytische Wirksamkeit die Lösungen von

$$0{,}006\ \frac{g}{\text{Liter}} \text{ kolloidales Platin.}$$

$$0{,}004\ \frac{g}{\text{Liter}} \text{ katalysierendes Eiweiß.}$$

Letztere Zahl ist ein sehr hoch geschätzter Maximalwert. Was mit Sicherheit aus dieser Überschlagsrechnung hervorgeht, ist, daß die katalytische Wirksamkeit der Katalase außerordentlich viel größer ist, als diejenige des kolloidalen Platins.

In der Pflanzenzelle dürfte die Katalase mindestens in der fünffach größeren Menge vorhanden sein, als in dem von mir extrahierten Saft. Eine Überschlagsrechnung zeigt dann, daß die katalytische Wirksamkeit der Katalasen in der Pflanzenzelle etwa gleich derjenigen von 3proz. kolloidalen Platin ist. Eine solche Lösung, welche Wasserstoffsuperoxyd augenblicklich zersetzen würde, ist nicht darstellbar.

Es scheint mir dieses Resultat nicht für die oben erwähnte Annahme von Loew zu sprechen, daß die Katalasen berufen sind, das giftige Wasserstoffsuperoxyd zu entfernen. Es ist kaum glaublich, daß der genannte Pilz eine zu diesem Zweck so auffallend große Menge katalysierenden Enzymes bildet.

Die im Boletussaft enthaltene Katalase ist nicht isoliert worden, sondern die Eigenschaften dieses Enzyms wurden direkt im verdünnten Preßsaft studiert. Zur Beurteilung der Funktion der Katalasen und Oxydasen im lebenden Pilz ist die Kenntnis der übrigen Bestandteile und Eigenschaften des Boletussaftes notwendig.

Die hierfür in Betracht kommenden Tatsachen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen*):

1. Neben der katalytischen Wirkung auf Wasserstoffsuperoxyd erzeugt der Preßsaft starke und fast augenblickliche Blaufärbung einer alkoholischen Guajaklösung.

Die Oxydase (Laccase), welche diese Färbung hervorruft, ist bei Luftabschluß in Lösung offenbar erheblich beständiger als die Boletuskatalase; wenn nach mehreren Tagen die Katalasereaktion des unverdünnten Saftes bereits vollständig verschwunden ist, erzeugt Guajaklösung immer noch deutliche Blaufärbung.

Außerdem ist zweifellos Amylase (Diastase) in der Lösung vorhanden. Während nämlich der frische Saft Fehlingsche Lösung nicht reduziert, findet man nach 1stündiger Einwirkung von Preßsaft auf selbst nicht reduzierende Stärkelösung deutliche Reduktion.

Versuche, die im Preßsaft vorhandenen Enzyme durch Alkoholzusatz zu isolieren, führten zu keinen befriedigenden Resultaten, da die ersten Fällungen im Vergleich mit dem Preßsaft sehr schwach wirksam sind.

---

*) Vgl. Hans und Astrid Euler, Svenska Vet. Akad. Ark. för Kemi 1, 365 (1904).

Abgesehen von Enzymen und mit Ammoniumsulfat fällbaren Eiweißkörpern ist der Saft reich an anderen Bestandteilen. Es wurde in 1 Liter Preßsaft 14,1 g bei 100° getrockneter Rückstand gefunden, welcher bei der Verbrennung 1,8 g Asche hinterließ; dagegen können durch Sättigen mit Ammoniumsulfat aus demselben Saft nur 5,6 g Trockensubstanz ausgefällt werden. Die Differenz, 8,5 g pro Liter, besteht zum größten Teil (etwa der Hälfte) aus Mannit und zu etwa 1/4 aus Trehalose, welch letztere in wohl ausgebildeten Kristallen isoliert werden konnte. Beim Eindunsten des Saftes scheidet sich eine schwarze, humusartige, amorphe Substanz ab; aus dem noch dunkelgefärbten Filtrat fällt Methylalkohol, bis zur Entfärbung zugesetzt, einen harzähnlichen in Wasser leicht löslichen Stoff. Diese beiden Oxydationsprodukte sind nicht näher untersucht worden. In der sirupösen Mutterlauge der Trehalose wurden ferner geringe Mengen eines reduzierenden Zuckers nachgewiesen, welche vielleicht während der Behandlung des Saftes durch Spaltung der Trehalose entstanden sind. Was schließlich die oben erwähnte Asche betrifft, so besteht dieselbe hauptsächlich aus Kaliumkarbonat, welches aus den Salzen verschiedener nicht näher identifizierter organischer Säuren entstanden ist, unter welchen die Fumarsäure besonders zu erwähnen sein dürfte.

Frühere Analysen des Preßsaftes sind mir nicht bekannt. Hingegen sind ganze Pilze dieser und verwandter Spezies sowohl in frischem wie in getrocknetem Zustand mehrfach untersucht worden. Es sind hier besonders die Arbeiten von Margewicz*) und Müntz**) zu erwähnen. Margewicz hat an Boletus scaber folgende Resultate***) erhalten:

	Im frischen Pilze		In der Trockensubstanz						
	Trockensubstanz	Wasser	Eiweiße	Fette	Mannit	Zucker	Asche	Zellstoff	Extraktivstoffe Verlust
Stiel . .	11,31	88,69	29,87	3,51	9,85	2,46	7,20	42,35	4,76
Hut . .	15,97	84,03	44,99	5,90	12,75	3,28	9,14	20,56	3,38

*) Just, Jahresberichte 1885, 85.

**) C. r. t. 79, 1182 (1874). Siehe Zopf, Pilze, in Schenk, Handbuch der Botanik 4 (1890).

***) Es ist einleuchtend, daß die Zahlen mit kritikloser Genauigkeit ausgerechnet sind, da diese natürlich zufolge individueller Schwankungen sowie unvermeidlicher Analysenfehler illusorisch wird.

Nach den Untersuchungen von Müntz enthalten Pilze in jungem Zustand mehr Trehalose, in älterem Zustand mehr Mannit. Nach dem gleichen Verfasser hat es den Anschein, als ob Mannit aus Trehalose im Pilze gebildet wird, wenn auch nicht immer nur aus diesem Zucker. Auch beim Penicillium glaucum dienen Kohlenhydrate zur Mannitbildung. In beiden Fällen ist zweifellos der Mannit ein Produkt der intramolekularen Atmung, etwa entsprechend dem Alkohol, welchen Gährungspilze mittels Zymase aus Traubenzucker erzeugen.

Indessen darf hieraus noch nicht geschlossen werden, daß die Katalase mit der intramolekularen Atmung in Zusammenhang steht. Wahrscheinlicher ist, daß die Oxydasen an der Mannitbildung bzw. an der intramolekularen Atmung beteiligt sind. Unter den Tatsachen, welche hierfür sprechen, scheint uns diejenige besonders bemerkenswert, daß beim Nachreifen von sauren Früchten, in welchen Katalase praktisch sehr wenig wirksam sein kann und auch tatsächlich unwirksam ist, intramolekulare Atmung insofern vorkommt, als unter Kohlensäureentwicklung Alkohole entstehen und einen Teil der Pflanzensäuren esterifizieren. Diese Organe enthalten Oxydasen, z. B. unreife Äpfel, wie dies schon O. Loew gefunden hat, und von uns wiederholt konstatiert wurde.

In Übereinstimmung hiermit stehen auch G. Bertrands Ansichten und neuere Versuche mit zellfreien Preßsäften vegetabilischen und animalischen Ursprungs, bei welchen Oxydation der Glykose beobachtet wurde. Nach Martin Hahn*), welcher mit einem zellfreien Preßsaft von Arum maculatum gearbeitet hat, sind die Oxydasen fähig, die im Pflanzenextrakt befindliche Glykose zu oxydieren; über das Vorkommen von Katalase in Arumpreßsaft ist nichts erwähnt. In wässerigen katalasefreien Oxydaselösungen aus Blutplasmafibrin fand vor kurzem N. Sieber**) die Fähigkeit vor, Glykose zu Kohlensäure zu oxydieren.***)

Was die Boletuskatalase betrifft, so dürfte dieselbe mit dem nicht unbeträchtlichen Fettgehalt der Pilze in Zusammenhang stehen†) Ich habe von dieser Erwägung ausgehend die Extrakte

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **33**, 3555.

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **39, 484 (1903).

***) Negative Resultate hat T. Porodko [Beih. z. Bot. Centralblatt **16**, 1 (1904)] erhalten, welcher aus einem allerdings sehr kleinen und nicht günstigen Versuchsmaterial (Kartoffelextrakt) den Schluß zieht, daß die Oxydasen kaum am Atmungsakte teilnehmen.

†) Den Preßsaft von Boletus haben wir selbst auf Fettgehalt nicht geprüft. Der Pilz selbst enthält, wie aus Margewicz' Analyse hervorgeht, etwa 5 Proz. Fett. Im allgemeinen ist Fett ein, wie es scheint, wesentlicher Bestandteil sowohl der höheren als der niederen Pilze.

einiger fettreicher Samen, so von Cucurbita melanosperma und Papaver somniferum untersucht und durchweg eine sehr starke Katalasewirkung konstatieren können. Indessen sind auch diese Extrakte keineswegs frei von Oxydasen und anderen Enzymen, sodaß der Versuch einer Reindarstellung wenig aussichtsvoll erschien.

Blut- und Fettkatalase.

Mit mehr Aussicht auf Erfolg wurde versucht, aus Blut und aus frischem Schweinefett reine Katalaselösungen darzustellen und hieraus die reinen Blut- und Fettkatalasen zu gewinnen. Inwieweit die Reindarstellung gelungen ist, läßt sich bei den bekannten außerordentlichen Schwierigkeiten, die bei diesen Arbeiten auftreten, noch nicht beurteilen.

Die bis jetzt erhaltenen Resultate sind die folgenden.

Die Darstellung der Blutkatalase geschah im wesentlichen nach demselben Verfahren, welches G. Senter angewendet hatte.

Defibriniertes Blut wurde mit ungefähr dem zehnfachen Volumen kohlensauren Wassers gemischt, 10 Stunden stehen gelassen und die Flüssigkeit von den festen Bestandteilen abfiltriert. Von diesem Filtrat wurden 2 Volume mit 3 Volumen 95proz. Alkohol gemischt und die Lösung vom Niederschlag befreit. Der Niederschlag wurde wieder mit Wasser digeriert und hierauf teils mit der dreifachen Menge Alkohol direkt gefällt, teils (wenn es auf die Isolierung des Enzyms ankam) zuerst filtriert und dann gefällt. Der hellbraune Niederschlag wurde nun vollständig im Exsikkator getrocknet, hierauf zerrieben und mit Wasser extrahiert. Die jetzt filtrierte klare und fast farblose Flüssigkeit, welche heftig auf Wasserstoffsuperoxyd einwirkte, wurde teils verdünnt und zu den folgenden Versuchen verwendet, teils durch Destillation unter vermindertem Druck eingeengt und wieder mit Alkohol gefällt und zwar mit 2 und 3 Volumen 95proz. Alkohol, teils wurde die Lösung direkt eingedampft und der Rückstand bei 100° getrocknet. Auch wurden Versuche angestellt, die Katalaselösungen durch Ausfrieren zu konzentrieren.

Daß die Geschwindigkeit, mit welcher Wasserstoffsuperoxyd in geringen Konzentrationen durch Blutkatalase zersetzt wird, sich durch eine Reaktionskonstante 1. Ordnung ausdrücken läßt, hat bereits Senter festgestellt. Bei allen Versuchen war die Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds in der Mischung etwa $^1/_{200}$-normal. Mit „Inkubationszeit“ ist diejenige Zeit bezeichnet, während welcher die Säure, bzw. Base in Berührung mit der Katalase war, bevor Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt wurde. Die Versuche, welche über den Einfluß der Säuren und Basen angestellt wurden, bestätigen im wesentlichen die Resultate von G. Senter. Dieselben seien deshalb nur im Auszug mitgeteilt. Die Versuche sind bei 0° ausgeführt.

$^1/_{10000}$ n-HCl	$^1/_{1000}$ n-HCl	$^1/_{1000}$ n-HCl
Inkubationszeit: 10 Min.	Inkubationszeit: 50 Min.	Inkubationszeit: 100 Min.
K = 0,0010	K = 0,0010	K = 0,0009

$^1/_{20000}$ n-HCl	
Inkubationszeit: 20 Min.	ohne Zusatz:
K = 0,009	K = 0,020.

$^1/_{10000}$ n-$Ba(OH)_2$	
Inkubationszeit: 30 Min.	ohne Zusatz:
K = 0,017	K = 0,019.

Die gefundenen Reaktionsverzögerungen resultieren offenbar aus der Einwirkung der Säure bzw. Base sowohl auf das katalysierende Enzym als auf das Wasserstoffsuperoxyd. Die beiden Einwirkungen lassen sich vorläufig noch nicht auseinanderhalten. Die hier angegebenen Werte sind hauptsächlich zum Vergleich mit den entsprechenden an Fettkatalase ermittelt worden.

Von den verschiedenen untersuchten Fettarten wurde zur Reindarstellung der Fettkatalase Schweinefett gewählt, das stets frisch in großen Mengen zugänglich war. Das Alter des Fettes, d. h. die Zeit zwischen dem Schlachten des Tieres und der Verarbeitung des Fettes ist nämlich von großem Einfluß auf die Menge aktiver Katalase, welche extrahiert werden kann. Etwa 1 bis 2 Tage alte Fette liefern noch sehr wirksame Enzymlösungen, später nimmt die Wirksamkeit rasch sehr erheblich ab.

Geschabtes Schweinefett wurde mit dem gleichen Gewicht Wasser und dem vierfachen Gewicht Seesand in kleineren Portionen in einer Reibschale verrieben. Dann wurde das Gemisch drei Stunden bei 30° sich selbst überlassen. Das Gemisch kühlte sich während weiterer 5 Stunden auf Zimmertemperatur (15°) ab, worauf das Extrakt abgegossen (nicht abgepreßt) wurde. Das Filtrat wurde nun auf 0° abgekühlt und wieder filtriert. Nun wurde das Extrakt mit 3, 4 und 5 Volumen Alkohol und 1 Volum Äther versetzt. Der Niederschlag wurde nach $^1/_2$ bis 1 Stunde von der Flüssigkeit getrennt, abgepreßt und sofort mit Wasser digeriert, wodurch der größte Teil wieder in Lösung ging. Es wurde wieder mit Alkohol gefällt und der nun erzeugte Niederschlag getrocknet. Das hieraus mit Wasser erhaltene Extrakt wurde untersucht. Die bei zwei Versuchsserien zum Zweck der Analyse erzeugte dritte Fällung war so gering, daß sie nur zu qualitativen Eiweißproben hinreichte. Dieselben stimmten indessen vollständig mit den an der zweiten Fällung erhaltenen Resultaten überein. Auf die mit diesen Präparaten erhaltenen analytischen Resultate wird in anderem Zusammenhang zurückgekommen werden.

Erhebliche Unterschiede zwischen der Fett- und der Blutkatalase zeigten sich bei der Einwirkung von Säuren und Basen. Die folgenden Versuche sind bei 10° ausgeführt.

I.

$^1/_{10000}$ n-HCl	$^1/_{10000}$ n-HCl	$^1/_{10000}$ n-HCl
Inkubationszeit: 10 Min.	Inkubationszeit: 50 Min.	Inkubationszeit: 100 Min.
K = 0,058	K = 0,060	K = 0,060

ohne Zusatz: K = 0,063.

II.

$^1/_{2000}$ n-HCl	$^1/_{2000}$ n-HCl	$^1/_{200}$ n-HCl
Inkubationszeit: 20 Min.	Inkubationszeit: 75 Min.	Inkubationszeit: 10 Min.
K = 0,053	K = 0,051	K = 0,050
$^1/_{200}$ n-HCl	$^1/_{500}$ n-Ba(OH)$_2$	$^1/_{500}$ n-Ba(OH)$_2$
Inkubationszeit: 45 Min.	Inkubationszeit: 15 Min.	Inkubationszeit: 40 Min.
K = 0,0017	K = 0,040	K = 0,040
	ohne Zusatz: K = 0,060.	

III.

$^1/_{10000}$ n-HCl	$^1/_{10000}$ n-HCl	$^1/_{2000}$ n-HCl
Inkubationszeit: 30 Min.	Inkubationszeit: 60 Min.	Inkubationszeit: 40 Min.
K = 0,0065	K = 0,0065	K = 0,0018
	ohne Zusatz: K = 0,0090.	

Dagegen erwies sich die Wirksamkeit beider Katalasen pro Gewichtseinheit Trockensubstanz sehr nahe gleich.

Diejenige Lösung der Fettkatalase, welche an katalytischer Wirksamkeit einer kolloidalen Platinlösung von 0,006 g pro Liter gleichkommt, enthielt 0,0015 $\frac{\text{g}}{\text{Liter}}$ Trockensubstanz, welche aus der eingeengten Lösung durch Alkohol und Äther ausgefällt werden konnten. Nimmt man für die eiweißartige Enzymsubstanz das gering geschätzte Molekulargewicht 1000, so würde sich eine Molekularkonzentration von 0,0000015 g $\frac{\text{Mol.}}{\text{Liter}}$ ergeben. Eine Konzentration von der gleichen Größenordnung wurde für das katalysierende Enzym des Blutes gefunden, nämlich rund 0,001 g Liter Trockensubstanz entsprechend etwa 0,000001 g $\frac{\text{Mol.}}{\text{Liter.}}$ Diese Übereinstimmung scheint mir bemerkenswert.

Bleibt man nun bei der Voraussetzung, daß die wasserstoffsuperoxydzersetzenden Enzyme eine bestimmte Gruppe für sich bilden, so kommt man zurück zu der biologisch wichtigen Frage: Welche Aufgabe haben diese Enzyme im Organismus?

Die erwähnte Annahme von Loew für Pflanzenkatalasen stützt sich auf die vielfach hypothetische intermediäre Bildung von Superoxyden. Für eine solche Annahme dürfte das Vorkommen der Katalasen in vielen tierischen Organen noch weniger Anhaltspunkte bieten als in pflanzlichen, z. B. im tierischen Fettgewebe, wo eine intermediäre Bildung von Wasserstoffsuperoxyd oder anderen Superoxyden durch keine Tatsache gestützt wird.

Stellt man die Organe, in welchen Katalasen nachgewiesen wurden und in besonders starker Konzentration vorkommen, zu-

sammen, so läßt sich zeigen, daß überall, wo Fett gebildet bzw. umgesetzt wird, Katalasen zu finden sind.

So ist durch die Untersuchungen von W. Sigmund*) und von F. R. Green**) das Vorkommen von Lipasen in Senf-, Rizinus- und Kürbissamen bewiesen worden; die Extrakte dieser Samen zersetzen, wie ich fand, heftig Wasserstoffsuperoxyd. Penicillium glaucum und Aspergillus niger spalten Wasserstoffsuperoxyd (Loew loc. cit.) und Fett (Gérard***), Camus†). Diese beiden Fähigkeiten zeigt auch in recht hohem Grade die Hefe (Delbrück; Issajew).

Noch auffallender ist die Parallelität in der Fähigkeit Ester und Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen bei den Extrakten tierischer Organe, wie des Pankreas und der Leber — eingehende Studien über diese Enzyme verdanken wir Kastle und Loevenhart — des Blutes und Serums [Hanriot]††) und des Darmes (Boldireff). Indessen erschwert der Enzymreichtum dieser Organe die Identifizierung der einzelnen Enzyme.†††) Ein bedeutend günstigeres Versuchsmaterial liefert in dieser Hinsicht das tierische Fettgewebe.

Wird frisches Schweinefett mit dem gleichen Gewicht Wasser bei 40° eine Stunde lang extrahiert und der Auszug nach dem Abkühlen auf 35° filtriert, so wird eine klare Lösung erhalten. Diese wirkt sehr kräftig zersetzend auf Äthylbutyrat.

Unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln wurden im Thermostaten bei 35° gleiche Volumina eines wässerigen Schweinefettextraktes und einer bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung von Äthylbutyrat gemischt. Von Zeit zu Zeit wurde in 10 ccm der Mischung mit Baryt die frei gewordene Buttersäure titriert.

Um eine Vorstellung vom Reaktionsverlauf zu geben, sei ein Versuch angeführt. In folgender Tabelle bedeuten t die Zeiten in Minuten, x die zur Zeit t zur Titration verbrauchte Anzahl ccm Barytlösung, k die nach der Formel $\frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ berechneten Reaktionskonstanten.

---

*) Sitz.-Ber. Wien. Akad. **99**, I, 407; **100**, I, 328, 101, I, 549 (1890 bis 1892).

) Proc. Roy. Soc. **47, 146; **48**, 370 (1901).

***) C. r. **124**, 370 (1897).

†) Soc. Biol. **49**, 192 (1897).

††) Siehe hierzu Arthus, Journ. de Phys. et Path. **6**, 1902.

†††) Ein weiteres interessantes, näher zu verfolgendes Beispiel bietet die Milch, deren Katalasewirkung von Raudnitz, Bredig, Reiss und Faitelowitz (loc. cit.) studiert ist, während Marfan und Gillet [Monatsschr. f. Kinderkrankheiten **1**, 57 (1902)] und E. Moro [Jahrb. f. Kinderheilkunde **56**, 392 (1902)] Lipase in der Milch nachwiesen.

t	x	a – x	k
0	0	2,70	—
2	0,3	2,40	0,0256
6	0,75	1,95	0,0235
9	1,05	1,65	0,0237
16	1,65	1,05	0,0250

Wie ersichtlich, wirkt das gewonnene Extrakt sehr kräftig hydrolysierend.

Alle bis jetzt bekannten Tatsachen deuten auf die peroxydzersetzende Wirkung der lipolytischen Extrakte hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Der Preßsaft von Boletus scaber zersetzt Wasserstoffsuperoxyd mit großer Heftigkeit. Die Wirkung dieses Enzyms ist während mehrerer Tage so gut wie konstant, wird schon durch sehr geringe Mengen schwacher Säuren aufgehoben und durch Basen in sehr geringer Konzentration befördert. Das Enzym schließt sich damit der β-Katalase O. Loews an.

   Die Zersetzung des Wasserstoffsuperoxyds durch die „Boletus-Katalase“ folgt bei Enzymüberschuß innerhalb gewisser Grenzen der Gleichung für Reaktionen 1. Ordnung.
2. Das wasserstoffsuperoxydspaltende Enzym der Pilze dürfte an der intramolekularen Atmung derselben nicht beteiligt sein.
3. Relativ sehr reine und kräftige „Katalase“lösungen wurden aus tierischem Fettgewebe gewonnen. Auch in diesen wird Wasserstoffsuperoxyd bei Enzymüberschuß innerhalb gewisser Grenzen nach der für monomolekulare Reaktionen gültigen Gleichung zersetzt. Der Einfluß von Säuren und Basen auf die zersetzende Wirkung des Enzyms hängt auch von der Konzentration des letzteren ab. Der Zusatz von Säuren und Basen bewirkt wahrscheinlich eine reversible Neutralisation des als amphoteren Elektrolyten fungierenden Enzyms; die Inkubationszeiten (mit Säuren und Basen) haben nämlich so gut wie keinen Einfluß auf die Wirksamkeit desselben.
4. Die wasserstoffsuperoxydzersetzenden Enzyme aus Pflanzen, Blut und Fett scheinen nicht identisch zu sein.

5. Eine Überschlagsrechnung bezüglich der absoluten Enzymkonzentrationen zeigt die sehr bedeutend größere katalytische Wirksamkeit des Enzyms im Vergleich zum kolloidalen Platin.
6. Der Parallelismus der Fett- bzw. Ester- und der Peroxydspaltenden Wirkung der pflanzlichen und tierischen Extrakte gestattet den Schluß, daß den lipolytischen Extrakten vorzüglich die Eigenschaft, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, zukommt.

Stockholms Högskola.

II.

Über die Oxydationsprodukte des Glycylglycins.

Von Dr. **Leo Pollak** (Wien).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

In einer jüngst erschienenen Arbeit über den oxydativen Abbau der Eiweißkörper spricht v. Fürth*) die Hoffnung aus, daß es gelingen dürfte, auf diesem Wege die Kenntnisse hinsichtlich des Zusammenhanges der bereits bekannten Elementarkomplexe des Eiweißes, namentlich hinsichtlich der Bindung der Stickstoffatome zu erweitern. Wenn wir an der von Hofmeister und E. Fischer entwickelten Vorstellung über den Aufbau der Eiweißkörper aus glycylglycinartigen Ketten festhalten, scheint es zweckdienlich, derartigen Untersuchungen von den einfachsten Verbindungen aus, gleichsam von unten her, entgegenzukommen, d. h. die Oxydationsprodukte der einfachsten Typen dieser Verbindungen (der Peptide) zu studieren. Ich habe deshalb auf Aufforderung von Herrn Prof. Hofmeister die Oxydation des niedrigsten Peptids, des Glycylglycins, mit Calciumpermanganat in Angriff genommen.

Das zu den Versuchen verwendete Glycylglycin wurde nach der Methode von E. Fischer**) dargestellt. Das aus dem Glycinanhydrid nach Vorschrift dargestellte salzsaure Glycylglycin wurde mit Silberoxyd in die freie Aminosäure übergeführt, die Identität und Reinheit des Präparates durch sein Verhalten beim Erhitzen (Bräunung bei 210°, Zersetzung zwischen 215 und 220°) festgestellt.

26 g Glycylglycin werden in 200 ccm destilliertem Wasser gelöst (schwach alkalische Reaktion) und hierauf 72 g Calciumpermanganat in 100 ccm Wasser gelöst, unter Eiskühlung langsam zutropfen gelassen, das ist die für 4 Atome O auf 1 Mol. Glycylglycin berechnete Menge. Während der Oxydation tritt starker Blausäuregeruch auf. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird vom Manganschlamm

---

*) Diese Beiträge **6**, 296.

) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **34, 2868.

abfiltriert. Er enthält kohlensauren Kalk; Calciumoxalat läßt sich darin nicht nachweisen.

Das Filtrat ist eine klare, nur ganz leicht gelblich tingierte Flüssigkeit von alkalischer Reaktion, die mit konzentrierter Salzsäure nicht in der Kälte wohl aber beim Erhitzen Oxalsäure abspaltet, die beim Übersättigen mit Ammoniak als oxalsaurer Kalk ausfällt; bei länger fortgesetztem Kochen wird mehr Oxalsäure erhalten. Beim Kochen mit Barytwasser entsteht ebenfalls Oxalsäure, dabei entweicht Ammoniak. Mit verdünntem Kupfersulfat und Natronlauge gibt die Flüssigkeit eine deutliche, rotviolette Biuretreaktion. Um die Flüssigkeit von gelöstem Calciumhydroxyd zu befreien, wird Kohlensäure eingeleitet; es fällt jedoch auch bei längerem Stehen in der Wärme kein Niederschlag aus. Hierauf wird das Filtrat im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur eingeengt, wobei ein schwach alkalisches Destillat übergeht, worin sich Ammoniak nachweisen läßt und die Lösung eine rötliche Farbe annimmt. Es fällt ein feinkörniger kristallinischer Niederschlag aus, der abfiltriert, erst mit verdünntem Alkohol, dann mit wenig kaltem Wasser gewaschen wird. (Er geht dabei jedoch teilweise in Lösung und zwar umso leichter, je stärker er noch mit Mutterlauge verunreinigt ist.)

Filtrat und Waschwasser werden vereinigt und bis zur bleibenden Trübung mit Alkohol bis zu etwa 60 Proz. versetzt. Nach längerem Stehen setzt sich ein kristallinischer Niederschlag ab.

Die vereinigten Niederschläge werden in wenig Wasser suspendiert, mit Salzsäure versetzt, bis sich nichts mehr löst; die filtrierte Lösung wird durch Einleiten von gasförmigem Ammoniak neutralisiert. Es entsteht ein weißer, gut kristallisierter Niederschlag, der in kaltem Wasser fast gar nicht, in heißem nur schwer löslich ist. Er wird salzfrei gewaschen und noch einmal in gleicher Weise umkristallisiert. Er fällt jetzt in glänzend weißen, teilweise schon makroskopisch erkennbaren Kristallen aus. Unter dem Mikroskope erweisen sich die gut ausgebildeten Formen als Prismen mit aufgesetzten Pyramiden, daneben sieht man rhombische Tafeln. Im ganzen wurde etwa 2,50 g dieser Substanz erhalten.

Das erhaltene Kalksalz ist in heißem Wasser schlecht, in Äthylalkohol, Äther, Chloroform gar nicht löslich. Es gibt keine Biuretreaktion. Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure sowie beim Kochen mit Barytwasser wird Oxalsäure und Ammoniak abgespalten. Beim Erhitzen mit stickstofffreier Magnesia usta entsteht kein Ammoniak.

Die im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werte:

0,2095 g Substanz verlieren bei längerem Erhitzen bis 130° 0,0572 g.

0,1453 g Substanz geben 0,0988 g CO_2 und 0,0585 g H_2O.

0,1334 g Substanz geben 6,39 ccm N bei 17,9° Temperatur und 765 mm B.

0,1799 g Substanz geben 0,0393 g CaO.

	Gef.	Ber. für $C_4H_3NO_5Ca + 4\,H_2O$
Ca	15,60 Proz.	15,56 Proz.
C	18,54 „	18,67 „
H	4,47 „	4,28 „

	Gef.	Ber. für $C_4H_3NO_5Ca + 4H_2O$
N	5,54 Proz.	5,44 Proz.
Kristallwasser	27,30 „ *)	28,01 „

Nach dem Ergebnisse der Analyse und den beschriebenen Reaktionen kann wohl kein Zweifel bestehen, daß es sich um das Ca-salz der Säure $\begin{array}{l}CO.COOH\\ \dot{N}H.\dot{C}H_2.COOH\end{array}$ der Oxalylaminoessigsäure handelt.

Um den Beweis für obige Formel zu ergänzen, habe ich eine quantitative Bestimmung der durch Salzsäure abspaltbaren Oxalsäure durchgeführt.

0,3917 g der im Vakuumexsikkator getrockneten Substanz werden durch etwa 6 Stunden mit siedender Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) am Rückflußkühler gespalten. Hierauf wird mit Ammoniak übersättigt, etwas reines Chlorcalcium zugefügt und mit Essigsäure angesäuert. Der ausgefällte oxalsaure Kalk wird abfiltriert, chlorfrei gewaschen, getrocknet, erst gewogen und dann die Ca-Bestimmung in ihm ausgeführt. 0,3917 g Substanz liefern 0,1941 g oxalsauren Kalk. Derselbe gibt beim Veraschen 0,0776 g CaO**).

Legt man den Ca-Wert zugrunde, so berechnen sich 0,1772 g oxalsauren Kalks, das ist 45,23 Proz. der gespaltenen Substanz. Die obige Formel verlangt 49,80 Proz. Ca.

Es wurden also über 90 Proz. der theoretisch möglichen Menge oxalsauren Kalks erhalten. — Der Befund von Ammoniak unter den Spaltungsprodukten weist darauf hin, daß die Substanz beim Kochen mit Säure oder Barytwasser zunächst in Essigsäure und Oxaminsäure, also nach folgendem Schema: $\begin{array}{l}CO.COOH\\ \dot{N}H \mid CH_2.COOH\end{array}$ zerfällt. A priori wäre auch folgende Spaltung: $\begin{array}{l}CO.COOH\\ \hline NH.CH_2.COOH\end{array}$ denkbar gewesen. Daß diese Art des Zerfalls nicht eintritt, war schon dadurch wahrscheinlich, daß es mir bei wiederholtem Versuche nicht gelang, aus den Spaltprodukten Glykokoll zu isolieren.

Dagegen ließ sich nach Spaltung mit Barytwasser und Entfernung des oxalsauren Baryts Essigsäure als Essigäther nachweisen.

Zur Identifizierung der übrigen bei der Oxydation entstandenen Produkte wurden Filtrat und Waschwässer nach Ausfällung der eben beschriebenen Substanz auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Es erfolgt keine kristallinische Ausscheidung. Der Sirup wird

*) Der Wert für Kristallwasser ist etwas zu niedrig. Die Substanz scheint die letzten Reste desselben nur sehr schwer abzugeben, da sie bei 130°, ohne sich zu zersetzen, noch an Gewicht verliert.

**) Der Wert für oxalsauren Kalk ist etwas zu niedrig, da sich das Filter beim Trocknen bräunte. (Daher der Ca-Gehalt desselben zu hoch: Gef. 28,54 Proz., Ber. f. $(COO)_2Ca + H_2O$ 27,39 Proz.).

zum Nachweise eventuell gebildeten Harnstoffes mit Alkohol-Äther ausgezogen, letzterer verdunstet. Es bleibt kein Rückstand; Harnstoff ist also nicht vorhanden. Hierauf wird der Sirup wieder in Wasser gelöst und mit Mercurinitrat ausgefällt. Der flockige Niederschlag wird mit heißem Wasser gewaschen, darauf mit Schwefelwasserstoff zerlegt und vom Quecksilbersulfid abfiltriert. Das Filtrat gibt wieder deutliche Biuretreaktion, spaltet beim Kochen mit Salzsäure Oxalsäure, beim Kochen mit Magnesia usta Ammoniak ab. Mit Silbernitrat gibt es einen flockigen Niederschlag. Beim Kochen mit Kupferkarbonat entsteht eine dunkelblaue Lösung, die beim Eindampfen teils als Lack, teils als körnige Masse zurückbleibt. Mit methylalkoholischer Kupferacetatlösung entsteht ein amorpher Niederschlag. Die letzt angeführte Reaktion wird zur Isolierung benützt, das Kupfersalz mit kaltem und heißem Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Es stellt ein äußerst hygroskopisches, amorphes Pulver von grüner Farbe vor.

0,124 g Substanz geben 0,0821 g CO_2 und 0,0235 g H_2O.

0,1431 g Substanz geben 9,11 ccm N bei 21,8° und 762,5 mm B.

	Gef.	Ber. für C_3NHO_5Ca
C	18,05 Proz.	18,49 Proz.
H	2,10 „	0,51 „
N	7,38 „	7,19 „

Nach der Analyse könnte es sich um das Kupfersalz der Säure

CO OH
NH . CO . CO OH handeln. Die Abspaltung von Ammoniak und Oxalsäure wäre gut verständlich, schwer aber, daß diese saure Verbindung die Biuretreaktion gibt. Für weitere Untersuchungen reichte die erhaltene Menge nicht aus.

Bei einem anderen Versuche gelang es, diese Substanz kristallinisch zu erhalten, indem nach Reinigung über die Quecksilberverbindung wie oben im Vakuum auf wenige ccm eingeengt wurde. Beim Stehen in der Kälte kristallisierte eine gelblich gefärbte Substanz in kleinen prismatischen Formen aus, die in heißem Wasser gut, in Alkohol nicht löslich war und die oben beschriebenen Reaktionen gab. Die wässerige Lösung reagierte gegen Lackmus deutlich sauer und gab mit Dimethylamidoazobenzol schwache Rotfärbung. Die erhaltene Menge reichte nicht zur Analyse.

Bei der Oxydation von Glycylglycin mit Calciumpermanganat entsteht somit Oxalylaminoessigsäure. Ein Silbersalz dieser Säure haben bereits Kerp und Unger*) durch Einwirkung von Baryt auf Amidooxalylglykokoll in der Kälte erhalten. Ebenso konnten sie den Ester dieser Säure (Oxaminessigsäure der Autoren) durch Einwirkung von Äthyloxalsäurechlorid auf Glykokollesterchlorhydrat darstellen. Er ist ein farbloses Öl, das bei 12 mm Druck bei 197 bis 198° siedet.

Die Oxydation des Glycylglycins führt somit nicht direkt zur Spaltung des Peptids sondern zur Bildung sauerstoffreicherer Peptide.

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **30**, 579.

In Rücksicht auf das eingangs Gesagte verdient die Oxalylessigsäure deswegen Interesse, weil sie einen sehr einfachen Typus jener sauren Körper repräsentiert, die bei der Säurespaltung Oxalsäure und Ammoniak liefern, sich also den Oxyprotsäuren analog verhalten. Es ist dabei bemerkenswert, daß der im Glycylglycin festgebundene Stickstoff in der Oxalylaminoessigsäure bereits derart gelockert ist, daß er durch Säure oder Alkali abgespalten werden kann.

Es wirft das ein Licht auf die Tatsache, daß die hochoxydierten Produkte des Kaseins, wie die Kyroprotsäuren v. Fürths, 50 Proz. des Gesamtstickstoffs durch Säure als Ammoniak abspalten lassen.

Man ist daher, glaube ich, wohl berechtigt, sich die Oxyprotsäuren zum Teile aus Oxalyl-aminosäuren-komplexen aufgebaut zu denken.

Als Nebenprodukt der Oxydation resultierte eine saure Substanz, die die Biuretreaktion gab; leider in so geringer Menge, daß sie nicht identifiziert werden konnte. Es ist nicht ohne Interesse, daß aus dem „abiureten“ Glycylglycin durch einen oxydativen Vorgang ein Körper entsteht, der diese Reaktion gibt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. E. Freund, Vorstand des pathologisch-chemischen Laboratoriums der k. k. Krankenanstalt Rudolfstiftung in Wien, für das liebenswürdige Entgegenkommen zu danken, mit dem er mir die Vollendung dieser Arbeit in seinem Laboratorium ermöglichte.

III.

Über die Bestimmung des Arginins mit Permanganat.

Von Dr. **Gustav Orglmeister**, Assistenten.

Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität zu Prag.

I.

In einer im hiesigen Institute ausgeführten Arbeit hat Pommerrenig*) anhangsweise die Bemerkung gemacht, „daß es ihm nicht gelungen sei, im Sinne der Angaben von Lossen durch Oxydation von Eiereiweiß oder Kasein auch nur eine Spur Guanidin zu erhalten“.

Ein Jahr später (1903) gaben Kutscher und Zickgraf**) eine bequeme und einfache Methode an, aus Leim durch Oxydation mit Permanganat, und zwar mit übermangansaurem Kalk, Guanidin darzustellen. Hierbei bemerken die Verfasser, daß sie nicht wissen, warum Pommerrenig bei seinen Versuchen zu negativen Resultaten gelangt sei. Es lag daher für uns nahe, die Versuche, die Pommerrenig bei seiner Untersuchung über Guanidinzersetzung im Tierkörper nur gelegentlich angestellt hatte, zu wiederholen.

Hierbei wurde sehr bald die Erklärung für den negativen Ausfall der Versuche Pommerrenigs gefunden. Einmal arbeitete Pommerrenig, wie er ja ausdrücklich hervorhebt, mit der Methode von Lossen, welche sich wesentlich von der von Kutscher und Zickgraf in Anwendung gebrachten unterscheidet; er verwendete nicht das bedeutend vorteilhaftere Calciumpermanganat, sondern Kaliumpermanganat; er ließ das Oxydationsmittel nicht in der Siedehitze, sondern in der Kälte einwirken, wobei die Zersetzung der Eiweißkörper lange keine so vollkommene ist und jedenfalls auch unter Bildung von den Guanidinnachweis

*) Über Guanidinzersetzung im Tierkörper. Diese Beiträge **1**, Heft 10 bis 12 (1902).

**) Die Bildung von Guanidin bei Oxydation von Leim mit Permanganaten. Sitzungsber. d. preuß. Akad. 28 (1903).

störenden Zwischenprodukten erfolgt. Die Menge des hierbei in Betracht kommenden Permanganates ist eine vielmal kleinere als bei der Oxydation in Siedehitze, und hiervon hängt wesentlich die Ausbeute an Guanidin ab. Ferner arbeitete Pommerrenig nicht mit Leim, der die Muttersubstanz des Guanidins, das Arginin, in größerer Menge enthält als andere Eiweißkörper und wegen seiner Löslichkeit in heißem Wasser für diese Methode besonders geeignet ist, sondern mit Eiereiweiß und Kasein. Die letzteren Körper enthalten viel weniger Arginin als der Leim (Kasein bleibt nach unseren Versuchen, die auch mit den während unserer Untersuchungen erschienenen Angaben von Otori*) übereinstimmen, mit einem Arginingehalt von 3,6 Proz. weit hinter dem 7 Proz. Arginin enthaltenden Leim zurück). Sodann wird Kasein wegen seiner Unlöslichkeit in Wasser selbst von siedender Permanganatlösung nur schwer uud langsam angegriffen und bei der Einwirkung von kaltem Permanganat muß seine Angreifbarkeit noch viel geringer sein. Selbst nach der verbesserten Methode von Kutscher und Zickgraf erhielten wir namentlich bei Eiereiweiß, anfangs auch bei Kasein negative oder nur schwach positive Befunde, solange wir als Fällungsmittel des Guanidins gleich wie Pommerrenig gesättigte Pikrinsäurelösung verwendeten. Erst als wir das Verfahren ganz anders als Lossen und Pommerrenig in der weiter unten näher beschriebenen Weise durchführten, gelangten wir auch bei diesen Eiweißkörpern zu befriedigenden positiven Resultaten. Hiermit scheint uns zur Genüge dargelegt, warum das Arbeiten nach Lossen negative Resultate erzielen muß.

Während wir mit der Ausarbeitung unseres Verfahrens und der Aufklärung obigen Widerspruches beschäftigt waren, erschienen die Mitteilungen von Zickgraf**) und Otori, wodurch ein Teil unseres Arbeitsprogrammes bereits seine Lösung gefunden hat. Ich beschränke mich deswegen im nachfolgenden darauf, dasjenige Verfahren anzuführen, das sich nach vielfachen Versuchen schließlich als zweckmäßig erwiesen hat. Bei dem Umstande, daß die Bestimmung des Guanidins zur Charakterisierung der einzelnen Eiweißkörper verwendet werden soll, dürfte nachfolgende Mitteilung, wenn sie auch zum Teil nur mehr eine Bestätigung der von den genannten Autoren nachgewiesenen Tatsachen bringt, nicht ganz wertlos sein.

II.

Soll in einem Eiweißkörper oder, was von vornherein meine Absicht war, in einem Organ der Argininгehalt bestimmt werden, so ist der erstere möglichst rein dargestellt zu verwenden (befreit von allen flüchtigen Stoffen, löslichen Substanzen, Salzen), das

*) Die Oxydation des Pseudomucins und Kaseins mit Calciumpermanganat. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, Heft 1 u. 2.

) Die Oxydation des Leims mit Permanganaten. Zeitschr. f. physiol. Chemie **41, Heft 3 (1904).

letztere nur in blutleerem Zustande heranzuziehen. Das weiter eingeschlagene Verfahren besteht aus folgenden Abschnitten:

1. Hydrolyse des gewogenen Eiweißkörpers mit Schwefelsäure von der unten angegebenen Konzentration.

Versuche mit Unterlassung dieser Vorbehandlung belehrten uns, daß die Resultate bei Eiweißkörpern, die behufs ihrer Reindarstellung koaguliert, also in unlösliche Form gebracht worden waren, erhebliche Differenzen darboten. Als Grund hierfür stellte sich heraus, daß bei nicht derartig vorbereiteten Eiweißkörpern trotz tagelanger energischer Oxydation immer noch unangegriffene Reste durch den sie einhüllenden Manganschlamm der Reaktion entzogen werden.

2. Oxydation: Hierbei bewährt sich in ausgezeichneter Weise das von Kutscher und Zickgraf empfohlene Calciumpermanganat.

3. Bestimmung des erhaltenen Guanidins durch Wägung oder Stickstoffbestimmung.

In allen Einzelheiten beschrieben gestaltet sich das Verfahren demnach folgendermaßen:

Das Tier, dessen Organe zur Untersuchung herangezogen werden sollen, wird aus der Karotis verblutet. Die einzelnen Organe werden nach Tunlichkeit mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, vollständig zerkleinert, auf dem Wasserbade bei kleiner Flamme unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure getrocknet und zu einem möglichst feinen Pulver zerrieben. Dieses wird sodann chlorarm gewaschen, hierauf im Soxhlet-Apparat zuerst ungefähr 12 Stunden mit Alkohol und dann anderthalb Tage mit Äther behandelt und so von Farbstoffen, Fett usw. befreit. Der letzte Rest des Äthers wird durch Trocknen bei 40° entfernt. Von dem so gereinigten Pulver wird eine entsprechende Menge abgewogen, im allgemeinen 3 bis 5 g, mit der dreifachen Gewichtsmenge konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Menge Wasser versetzt und unter dem Rückflußkühler durch ungefähr 8 bis 10 Stunden hydrolysiert, bis eine homogene schwarz-braune, dickflüssige Lösung erhalten wird. Diese wird mit viel Wasser verdünnt, erhitzt, und dann wird zur heißen Flüssigkeit soviel Barythydrat in Pulverform hinzugefügt als der Rechnung nach notwendig ist, um die Schwefelsäure zu neutralisieren. Der Niederschlag von schwefelsaurem Baryt wird dekantiert, reichlich mit Wasser versetzt, aufgekocht, abermals dekantiert und diese Prozedur noch 1 bis 2 Mal wiederholt. Die vereinigten Flüssigkeitsmengen werden (falls das Volum zu groß, nach vorgängigem Einengen) in einen ungefähr 1½ l fassenden Erlenmeyerschen Kochkolben gebracht; dann wird nötigenfalls noch einmal genau neutralisiert und hierauf langsam mit einer 10proz. Lösung von käuflichem Calcium hypermanganicum technicum so lange versetzt und im Sieden erhalten als sich noch eine nennenswerte Menge desselben in längerer Zeit (in ungefähr einer Viertelstunde) entfärbt. In sechs bis acht Stunden ist die Oxydation für gewöhnlich beendet. Dank der bereits durch die Hydrolyse erfolgten Zersetzung der Eiweißkörper erfolgt sie ruhig und ohne stärkere Reaktionserscheinungen, während solche ohne eine der-

artige Vorbehandlung stürmisch auftreten und eine stete Beaufsichtigung erfordern. Das Oxydationsgemisch wird durch ein entsprechend großes Faltenfilter in eine Porzellanschale filtriert, der in dem Kolben zurückbleibende Manganschlamm einigemale mit Wasser aufgekocht, die vereinigten Filtrate werden auf dem Wasserbade bis auf ein kleines Volumen (ungefähr 20 ccm) eingeengt. War das Hydrolysat genau neutralisiert worden, so scheiden sich jetzt nur geringe Mengen schwerlöslicher Substanzen ab. Mit heißem Wasser werden diese durch ein möglichst kleines Faltenfilter in ein Becherglas nachgewaschen, in welches bereits die Lösung selbst abfiltriert worden war. Das ganze Filtrat, dessen Volumen höchstens 50 ccm beträgt, wird mit kalt gesättigter Natriumpikratlösung versetzt, und zwar mit dem 5 bis 6fachen Volumen. Es geht nicht an, statt des Natriumpikrats die weit weniger lösliche Pikrinsäure zu verwenden. Diese ergibt zwar bei einzelnen Körpern, so bei Leim und Blutserum, die gleichen Resultate, dagegen erzielt man damit bei Organen, mag man dieselben nun ohne Vorbehandlung verwenden oder sie zuerst entfetten und pulverisieren, fast gar keinen oder nur einen sehr geringen Niederschlag von Guanidinpikrat. Natriumpikrat, welches durch Neutralisieren einer gesättigten Pikrinsäurelösung mit der entsprechenden Menge von Natriumhydroxyd (auf 23 Gewichtsteile Pikrinsäure kommen 4 Teile Natriumhydroxyd) und nachheriges Auskristallisieren gewonnen wurde, löst sich ungefähr zehnmal reichlicher in Wasser als Pikrinsäure. Selbst heißgesättigte Pikrinsäurelösung kommt an Wirksamkeit der Natriumpikratlösung nicht gleich. Das Guanidinpikrat setzt sich sehr gut ab. Es kann schon nach wenigen Stunden auf ein gewogenes Filter gebracht und mit Pikrinsäurelösung gewaschen werden. Auf das einmal gefällte Guanidinpikrat hat Pikrinsäurelösung keinen lösenden Einfluß mehr. Das Filter wird getrocknet, mit Chloroform gewaschen und hierdurch von dem größten Teile der Pikrinsäure befreit, sodann abermals getrocknet und gewogen. Die Fehler, die hierbei dadurch entstehen, daß einerseits Guanidinpikrat in Chloroform nicht absolut unlöslich ist und daß andererseits die Pikrinsäure aus dem Filter nicht vollständig durch Chloroform entfernt wird, heben einander teilweise auf und sind außerdem so geringfügig, daß dieselben bei der Berechnung vernachlässigt werden dürfen.

Hierfür sei nachfolgender Beleg mitgeteilt:

Das Wasch-Chloroform von 5 Guanidinpikratniederschlägen mit einem Gesamtgewicht von 0,7 g wird nach schwachem Ansäuern mit Wasser ausgeschüttelt, wodurch das Guanidin und etwas Pikrinsäure in die wässerige Lösung gehen. Nach Entfernung der letzteren durch neuerliche Chloroformbehandlung wird in der farblosen Guanidinlösung der Stickstoffgehalt bestimmt (Kjeldahl). Das destillierte Ammoniak braucht 0,25 ccm $^1/_{10}$-n-HCl. Da 1 ccm $^1/_{10}$-n-HCl $\times$ 0,001 $\times$ 58 = Arginin in g, sowie 1 g Guanidinpikrat $\times$ $^{29}/_{48}$ = Arginin in g, so ergibt sich, daß auf das Waschchloroform von 0,14 g Guanidinpikrat (= $^1/_5$ der obigen Menge) durchschnittlich 0,05 ccm $^1/_{10}$-n-HCl = 0,00048 Guanidinpikrat zu Verlust gelangen, also rund bei jeder Probe durchschnittlich $^1/_2$ Milligramm, bei 0,3 g Guanidinpikrat (der durchschnittlich zur Wägung gelangten Menge) 1 Milligramm. Die verwendeten Filter besitzen einen Radius von 2 bis 3 cm; derartige Filter halten, mit gesättigter Pikrinsäurelösung durchtränkt und sodann, wie dies bei unseren Proben geschah, drei oder viermal

mit Chloroform nachgewaschen, kaum mehr als 1 Milligramm Pikrinsäure zurück, sodaß sich also die Fehler gegenseitig aufheben und vernachlässigt werden können.

Anfänglich wurden die auf das Filter gebrachten Guanidinpikratniederschläge nach der Methode behandelt, welche Pommerrenig in seiner oben genannten Arbeit empfiehlt. Danach werden dieselben mit Wasser in einen kleinen Scheidetrichter gespült, mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und solange mit Chloroform ausgeschüttelt, bis die über dem Chloroform stehende wässerige Guanidinlösung vollkommen farblos ist und so von Pikrinsäure gänzlich befreit zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet werden kann. Aus dem Stickstoffgehalt wird dann das Guanidin bzw. Arginin berechnet. Auf diese Weise wird das Guanidinpikrat in vollkommen exakter Art quantitativ bestimmt. Die Methode erfordert aber viel mehr Zeit als die Wägung; bei irgend größeren Mengen von Guanidinpikrat braucht man zum Ausschütteln sehr viel Chloroform. Dieser Umstand regte uns zu Versuchen an, welche dahin zielten, die Bestimmung des Guanidinpikrates zu vereinfachen, umsomehr als es auch erwünscht schien, eine Methode ausfindig zu machen, durch welche das Guanidinpikrat als solches identifiziert werden konnte. Es lag nahe, hierfür die Wägung des Guanidinpikrates heranzuziehen. Derselben mußte aber notwendig die Reinigung des Präparates vorangehen. Die ursprünglich hierfür von Emich*) angegebene Methode bewährte sich mir ebensowenig wie seinerzeit Pommerrenig. Beim Waschen des Pikrates auf dem Filter mit Wasser treten sehr große Verluste ein, bis zu 30 Proz. Das von Zickgraf und Otori benützte Verfahren, mehrmalige Umkristallisation des Pikrates aus Wasser und Korrektur der durch Wägung erhaltenen Zahl mit Berücksichtigung der Menge des verwendeten Wassers und der Löslichkeit des Pikrates darin, schien uns zu umständlich und bei den zum Teil recht geringen Pikratmengen auch schwer durchführbar. Es zeigte sich nun, daß die aus den verschiedenen Oxydationsgemischen erhaltenen Pikratniederschläge nach dem Auswaschen mit Chloroform durchwegs als nahezu reines Guanidinpikrat anzusprechen waren und daß die Wägungsmethode der Bestimmung durch Ermittlung des Stickstoffes nach Kjeldahl nicht wesentlich an Genauigkeit nachsteht, dabei aber doch eine Vereinfachung des Verfahrens bedeutet.

Ein und dieselbe Probe, zuerst gewogen und dann auf ihren Guanidin-N-Gehalt bestimmt, ergab bei der letzteren Bestimmung eben nur so viel weniger Guanidin, als durch das Chloroform in Lösung gegangen war, während hierbei natürlich die auf dem Filter zurückgebliebene Pikrinsäure nicht zur Deckung dieses Verlustes herangezogen wurde, da alle Pikrinsäure durch das Chloroform ausgeschüttelt worden war. Hierfür folgende Belege:

Eine Probe (getrocknetes, käufliches) Blutserum ergibt nach Ausführung des ganzen Ganges mittels der Wägung: 0,0580 g Arginin, mittels N-Bestimmung nach Kjeldahl: 0,0569 g Arginin.

Von der Dünndarmschleimhaut des Leimhundes (vergleiche untenstehende Tabelle) geben:

5 g gewogen 0,415 g Guanidinpikrat, d. i. 0,250 g Arginin;

*) Monatshefte f. Chemie 1891, S. 23.

mittels N-Bestimmung nach Kjeldahl: 42,0 $\frac{n\text{-}HCl}{10}$ = 0,244 g Arginin.

Die Fehler liegen also in den Milligrammen.

Nach alledem ist es daher zulässig und zweckmäßig, das Guanidinpikrat nach mehrmaligem Waschen mit Chloroform durch Wägung zu bestimmen.

Im Gange unserer Untersuchungen wurden wiederholt stichprobenweise Stickstoffbestimmungen des gewogenen Guanidinpikrates vorgenommen und stets erwiesen sich die hierbei auftretenden Differenzen als unbedeutend.

Für die Frage der Brauchbarkeit und Verläßlichkeit der ganzen Methode bleibt nur noch ein Punkt zu erledigen, welcher sich auf die Art der Oxydation mit Permanganat bezieht. Die Ausbeute an Guanidinpikrat ist bis zu einer gewissen Grenze abhängig von der Menge des zur Oxydation verwendeten Permanganates; nach Zickgraf ist die Reaktion dann als beendet anzusehen und die größte Ausbeute an Guanidin zu erwarten, wenn die Biuretreaktion in dem filtrierten Reaktionsgemisch eben verschwunden ist. Bei unseren Vorversuchen mit Stoffen, die uns in beliebiger Menge zur Verfügung standen, wie Leim, Blutserum und verschiedenen anderen Eiweißkörpern, zeigte sich, daß, wenn man die Oxydation so lange fortsetzt, als eben noch mehrere Tropfen der Permanganatlösung in nicht allzulanger Zeit (in einer Viertelstunde) entfärbt werden, die Resultate bei verschiedenen Parallelproben keinen großen Schwankungen unterworfen sind. Außerdem habe ich auch, wo immer es die Menge des Ausgangsmaterials erlaubte, mehrere Proben aufgestellt und mich dabei jedesmal überzeugt, daß die einzelnen Resultate nur wenig von einander abweichen. Bei irgend erheblichen Differenzen war natürlich die größere Zahl maßgebend.

III.

Mit Hilfe dieser Methode habe ich zunächst eine Anzahl von Eiweißkörpern auf ihren Argininngehalt untersucht. Die erhaltenen Resultate sind zum Teil in folgender Tabelle zusammengestellt; hierbei ist nur zu bemerken, daß alle diese Stoffe direkt der Oxydation unterworfen wurden ohne vorherige Hydrolyse, zu welcher ich erst durch die spätere Untersuchung der Organeiweißkörper geführt wurde. Insofern sind die erhaltenen Zahlen mit Ausnahme derjenigen des Leims, der wegen seiner Löslichkeit in heißem Wasser keiner Hydrolyse bedarf, als Minimumwerte zu betrachten.

	Menge in g	Volumen der verbrauchten 10 proz. Permanganatlösung in ccm	Guanidinpikrat in g	Arginin in g	Arginin in Prozenten
Leim (Handelsgelatine)	4 (bei 100° getrocknet)	260	0,4670	0,282	7,05
Rinderblutserum, getrocknet (käuflich)	4 lufttrocken, Eiweißgehalt 3,075 g	240	0,202	0,121	3,94 (des Eiweißgehaltes)
Kasein (Höchst)	2,5 lufttrocken = 2,25 bei 100° getrocknet	125	0,084	0,0508	2,25 (des bei 100° getrockneten Präparates)
Kasein	3,3, getrocknet = 2,97 g	165	0,112	0,0676	2,27
Eidotter	5,6 lufttrocken	240	0,270	0,163	2,9
Eiter (aus einem kalten Glutaealabsceß)	28 ccm = 2,14 g Eiweiß	146	0,149	0,090	4,2
Hornsubstanz, roh, entfettet	3,3 lufttrocken	165	0,3158	0,1914	5,8
Mammacarcinom (Gallertkrebs)	2,04 trock. Pulver	150	0,168	0,1015	5

Eine nachträgliche Bestimmung des Argininggehaltes bei demselben Kaseinpräparat, jedoch ganz nach der oben beschriebenen Methode (also mit vorangehender Hydrolyse) durchgeführt, ergab folgendes Resultat:

Kasein, getrocknet	4,5 g Subst.	290 ccm 10 proz. Permanganatlösg.	0,2754 g Guanidinpikrat	0,1664 g Arginin	3,6 Proz. Arginin

Otori loc. cit. fand bei seinem Kaseinpräparat (bezogen von Grübler) folgenden Maximalwert:

Kasein	9,4 g getrocknet	500 ccm 10 proz. Permanganat	0,5464 g Guanidinpikrat	0,329 g Arginin	3,5 Proz. Arginin

IV.

Nunmehr konnte ich an die Bearbeitung einiger der sich ergebenden physiologischen Probleme denken. In dieser Richtung stellte ich mir vor allem zwei Fragen:

1. Ist es möglich, durch Verfütterung eines argininreichen Materiales, wie es der Leim darstellt, eine Zunahme des Arginingehaltes der Organe zu erzielen?

2. Kann man durch Zufuhr von Benzoesäure bei Vögeln, welche diese Säure gebunden an Diaminovaleriansäure als Ornithursäure durch die Nieren zur Ausscheidung bringen, bewirken, daß deren Organismus an Arginin verarmt und infolgedessen die Organzusammensetzung eine quantitativ abnorme wird?

Die erste Frage muß nach unseren in dieser Richtung angestellten Versuchen in verneinendem Sinne beantwortet werden. Es mag dies vielleicht zum Teil daran liegen, daß Hunde, welche zu diesen Versuchen verwendet wurden, nur mit Widerwillen Leim nehmen und überdies nur dann, wenn er reichlich mit anderer Nahrung vermengt ist.

Ein Hund im Gewichte von 9300 g, welcher innerhalb der Zeit von 10 Tagen neben $3^1/_2$ kg anderer Nahrung (Semmel, Fleischextrakt) 540 g Gelatine erhalten hatte, zeigte in seinen einzelnen Organen folgenden Argininгehalt:

	Gewicht g	10 proz. Permanganatlösung ccm	Guanidinpikrat g	Arginin g	Prozentgehalt an Arginin
Muskel	5,2	300	0,4054	0,245	4,7
Muscularis des Darms	5,5	330	0,4664	0,281	5,1
Mucosa des Darms	5	270	0,4159	0,25	5
Leber	5	270	0,226	0,1365	2,73
	5,7	320	0,277	0,167	2,9
	5,1	295	0,236	0,1426	2,8
	5	300	0,225	0,136	2,72
Nieren	3,8	200	0,2659	0,159	4,2
Herz	5,1	340	0,4220	0,254	5,08
Blut	5,5	310	0,186	0,112	2
	5,2	295	0,1905	0,114	2,2
	7	525	0,229	0,138	1,96
Milz	2,4	140	0,211	0,127	5,3

Diese Werte unterschieden sich nicht wesentlich von jenen, welche an zwei Normalhunden gewonnen wurden.

Hinsichtlich der zweiten Frage wurde der Versuch in folgender Weise durchgeführt:

I. Hahn, durch 4 Tage bei normaler Maisfütterung gehalten, wird am 1. III. 05 verblutet. Gewicht 1590 g.

Die einzelnen Organe, streng nach der oben angeführten Methode behandelt, ergeben folgenden Argininгehalt:

	Gewicht g	10 proz. Permanganatlösung ccm	Guanidinpikrat g	Arginin g	Prozentgehalt an Arginin
Muskel	5,0 5,2	270 260	0,438 0,434	0,264 0,262	5,3 5
Darm	5 2,15	300 140	0,411 0,177	0,248 0,107	4,96 4,97
Leber	3,8 2,5	180 130	0,285 0,195	0,172 0,118	4,5 4,7
Nieren	1,45	95	0,110	0,066	4,6
Magen	3,6	185	0.299	0,184	5,1
Herz	1,0	45	0,056	0,034	3,4
Blut	5,4 3,75	275 180	0,395 0,242	0,238 0,146	4,4 3,9

II. Hahn, durch 4 Tage in gleicher Weise gefüttert, Gewicht 2130 g. Innerhalb der nächsten 14 Tage erhält er mit derselben Nahrung im ganzen 21 g Natrium benzoicum. Sein Gewicht sinkt hierbei auf 1700 g. Tod am 15. III. 05 durch Verbluten. Über den Argininkgehalt seiner Organe gibt folgende Tabelle Aufschluß:

	Gewicht g	10 proz. Permanganatlösung ccm	Guanidinpikrat g	Arginin g	Prozentgehalt an Arginin
Muskel	5,7 4,3 7,8	285 215 400	0,425 0,299 0,596	0,256 0,184 0,359	4,5 4,3 4,6
Darm	2,9 1,7	170 90	0,250 0,128	0,151 0,077	5,2 4,6
Leber	1,75 1,5	95 100	0,101 0,100	0,061 0,060	3,6 4
Nieren	1,9	95	0,124	0,075	3,9
Magen	4,1 4,4	260 250	0,348 0,392	0,210 0,237	5,1 5,38
Herz	1,1	55	0,046	0,028	2,5
Blut	5,2 5,4	265 270	0,316 0,326	0,191 0,190	3,69 3,63

Die Möglichkeit, daß die Benzoesäure in elektiver Weise ein einzelnes Organ durch Argininentziehung schädigt, ist nach diesen Versuchen wohl auszuschließen. Eine tatsächliche Verminderung des Prozentgehaltes an Arginin ist zu verzeichnen im Muskel, in der Leber und im Blute. Die Unterschiede betragen allerdings

durchschnittlich kaum mehr als 1/2 Prozent. Diese Zahlen geben keinen absoluten Grenzwert der durch Benzoesäurezufuhr möglichen Argininentziehung, da durch die Fütterung ein steter Argininersatz (Aufnahme von Nahrungsarginin oder Synthese) stattgefunden haben muß. Es wäre nicht uninteressant, denselben Versuch am Hungertier zu wiederholen.

Eine weitere Verwendung der Methode in physiologisch-toxikologischer Richtung habe ich abgebrochen, da unterdessen von Kossel*) eine Mitteilung über den Arginingehalt der Leber in normalem Zustande und bei Phosphorvergiftung erschienen ist.

*) Berlin. klin. Wochenschr. Nr. 41, 1904.

IV.

Über den Umfang der Fettverdauung im Magen.

Von Dr. med. **Adolf Zinsser,** Assistenten der Klinik.

Aus der medizinischen Klinik zu Gießen. (Stellvertretender Direktor Privat-Dozent Dr. Franz Volhard.)

Die Frage der Fettverdauung im Magen, der man früher eine kaum nennenswerte Bedeutung beilegen zu können glaubte, ist in ein neues Stadium getreten, als Volhard, gelegentlich einer Nachprüfung der v. Meringschen Versuche über das Resorptionsvermögen des Magens entdeckte, daß Fette schon unter der Einwirkung des Magensaftes eine weitgehende Spaltung in Glycerin und freie Fettsäure erfahren, vorausgesetzt, daß sie als natürliche Emulsion der Verdauung unterworfen werden. Die geringen und dem scheinbar widersprechenden Werte, die andere Autoren (Marcet, Cash, Ogata, Klemperer und Scheuerlen) bei einschlägigen Versuchen gefunden hatten, lassen sich anscheinend lediglich darauf zurückführen, daß bei allen ihren Versuchen Fett in nicht emulgierter Form zur Verwendung kam.

Das wässerige Verdauungssekret kann mit einem mit Wasser nicht mischbaren Fett keine innige Vermengung eingehen, und so keine intensive digestive Tätigkeit entfalten. Volhard schloß an seine Beobachtungen weitere Studien an, und es gelang ihm, an der Hand zahlreicher Versuche nachzuweisen, daß es sich bei dieser Spaltung der emulgierten Fette um eine selbständige Funktion des Magensaftes handle. Eine Reihe seiner weiteren Arbeiten, sowie eine Dissertation von Stade erbrachten dann den wohl kaum noch anzuzweifelnden Beweis, daß der Prozeß auf einer Fermentwirkung beruht.

Ellinger hat die Volhardschen Resultate nachprüfen lassen, und sie, mit allerdings etwas geringeren Werten, bestätigt. Er führte auch den Nachweis, daß das Auftreten freier Fettsäure nicht auf Lecithinspaltung zurückzuführen ist. Pekelharing erwähnt in seiner Arbeit über das Pepsin, daß er die Volhardschen Beobachtungen an einem Hunde mit Pawlowscher Magenfistel bestätigen konnte. Wenn Inouye kürzlich behauptete, mit Glycerinextrakt der Magenschleimhaut keine Spaltung erzielt zu

haben, so stehen dem noch zu veröffentlichende Versuche aus unserem Laboratorium entgegen, die deutlich positive Resultate im Sinne der Volhardschen Lehre liefern. Es enthält also auch der Magensaft ein fettspaltendes Ferment, und Volhard und Stade konnten im Verlauf ihrer Untersuchungen darlegen, daß es sich durch ganz bestimmte, dem Pepsin und Lab sehr ähnliche, biochemische Eigenschaften charakterisiert.

Somit ergab sich eine Reihe vollkommen neuer Gesichtspunkte für die Beteiligung des Magens an der Verdauungsarbeit. Es liegt meines Wissens bisher in der Literatur keine Arbeit vor, die bei Prüfung der Verdauungsvorgänge in vivo die neuen Beobachtungen berücksichtigt. Die von Volhard angestellten Beobachtungen am lebenden Magen waren, wie Volhard selbst später entdeckte, mit einem erheblichen Versuchsfehler behaftet: Während der Trocknung des Verdauungsgemisches bei Zimmertemperatur auf Kaolin war die Spaltung weiter gegangen, sodaß die Resultate, 70 Proz. Spaltung in 2 Stunden, als viel zu hoch angesehen werden müssen. Volhard hat deshalb eine neue Methode zur Bestimmung der Fettspaltung ausgearbeitet, sie aber bisher nur bei theoretischen Untersuchungen verwandt. Seine im Reagensglas erzielten Resultate erheischen also eine Ergänzung durch Prüfung des Ablaufs der Fettspaltung in vivo, und ich verdanke Herrn Dr. Volhard die Anregung zu diesen Untersuchungen.

Es sollte also geprüft werden, wieviel Prozent einer verabreichten Fettemulsion während ihres Aufenthaltes im Magen der Spaltung unterliegen; diese Versuche konnten sich dann ergänzend den Kenntnissen anschließen, die wir durch die Publikationen von J. Müller über den Umfang der Eiweiß- und Stärkeverdauung im Magen gewonnen haben.

Das in Anwendung gebrachte Verfahren ist im wesentlichen das Folgende: Der Patient erhält morgens nüchtern ein später näher zu bezeichnendes Fettfrühstück, das nach einer bestimmten Zeit ausgehebert wird. 20 ccm der so erhaltenen Rückstände werden mit 75 ccm Äther unter Zufügung von 2 ccm Alkohol durch mehrere Minuten dauerndes, öfter wiederholtes Schütteln extrahiert. Nachdem man die Schichtung der Schüttelemulsion abgewartet hat, werden 50 ccm des Fettäthers in ein Kölbchen abgegossen. Hierzu werden 50 ccm säurefreien Alkohols*) gefügt, und nach Zusatz von Phenolphthalein wird durch Titration mit wässeriger $^1/_{10}$ Normalnatronlauge der Gehalt des Extraktes an freier Fettsäure bestimmt (Wert I). Durch Zusatz von 10 ccm Normalnatronlauge unterwirft man die noch in dem Gemische enthaltenen Neutralfette der

*) Der Alkohol wurde in 5 l-Flaschen im Wasserbad, das durch Zuleitung von Dampf erhitzt wurde, gekocht und mit $^1/_{10}$ Normal-NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert.

Verseifung, die bei Zimmertemperatur sicher in 24 Stunden vollendet zu sein pflegt. Das Gemisch enthält jetzt das gesamte extrahierte Fett in Form von Natronseifen, und außerdem einen Überschuß an freier Natronlauge. Fügt man nun 10 ccm*) Normalschwefelsäure zu, so wird davon ein Teil zur Neutralisierung der überschüssigen Lauge verwandt. Der Rest treibt aus den durch die Verseifung gewonnenen Natronseifen die Fettsäuren aus, und deren Quantität wird nun ebenfalls titrimetrisch bestimmt (Wert II). Aus den beiden Titerwerten I und II läßt sich dann nach der Gleichung $x = \frac{I \cdot 100}{I + II}$ die Größe der Spaltung in Proz. berechnen.

Um zugleich einen ungefähren Anhaltspunkt zu gewinnen über das Verhältnis der effektiven Spaltung zur Fermentkonzentration des betreffenden Magensaftes, wurde der Rest des Ausgeheberten jedesmal filtriert, 10 ccm des Filtrats mit 20 ccm einer Eigelbwasseremulsion (3 Eigelb auf 100) versetzt und 12 Stunden im Brutschrank belassen. Dieses künstliche Verdauungsgemisch wurde genau nach der angegebenen Methode weiter behandelt und die Fettspaltung bestimmt. Die von Volhard und Stade für das fettspaltende Ferment des Magens gefundene Regel, daß die Menge der Fermenteinheiten (F) gleich sei dem Quotienten aus dem Quadrat der Verdauungsprodukte (V) und der Zeit (T), ermöglichte dann, die in der angewandten Menge Magensaft enthaltene Zahl von Fermenteinheiten nach der Gleichung $F = \frac{V^2}{T}$ zu berechnen.

Das zur Verwendung kommende Fettfrühstück sollte eine natürliche Emulsion darstellen, und als solche lag die Verwendung von Milch, als in praxi am ehesten in Betracht kommend, am nächsten. Im Verlauf einer Reihe von Versuchen, bei denen ich den Patienten morgens nüchtern 500 ccm roher Milch verabreichte und nach 1 bis 2 Stunden ausheberte, erwies sich diese Form des Frühstücks jedoch als zu den Untersuchungen nicht geeignet.

Die Fällung der Milch erfolgte stets in äußerst groben, zähen Käsebrocken, die einer gleichmäßigen Extraktion erheblichen Widerstand entgegensetzten. Es gelang mir auch nicht, durch mechanisches Zerreiben der Masse in Porzellantiegeln oder durch stundenlange Extraktion im Schüttelapparat wesentlich bessere Resultate zu erzielen. Ebenso wenig erhielt ich brauchbare Werte bei der Verwendung von saurer Milch, oder bei Zusatz von Salzsäure vor der Extraktion.

Ich gab nun den Patienten eine Suspension von Eigelb in Bouillon. Zuvor angestellte Kontrollversuche erwiesen, daß sich das Gemisch gut extrahieren ließ; die Stammlösung enthielt durchschnittlich 3 bis 4 Proz. freier Fettsäure.

Das Gelbe von 2 Eiern wurde mit 500 ccm Bouillon fein verrührt und dem Patienten morgens nüchtern gereicht. Nach 1 bis 2 Stunden wurde ausgehebert, und bei der Untersuchung auf Fettspaltung ergaben sich folgende Werte (cf. Tabelle I):

*) Am bequemsten ist für die Normallösungen die Anwendung von 2 Stützerschen automatischen Revolverpipetten.

Tabelle I.

	Datum	Name	Verabreichte Speise	Verdauungszeit	Durch Ausheberung gewonnene Rückstände	Congo	Acidität: Freie HCl	Acidität: Alizarin	Acidität: Phenolphthalein	Zur Prüfung auf Fettspaltung wurden verwandt:	Menge d. zugegoss. Äthers	Menge d. zugegoss. Alkohols	Menge des abgegossenen Ätherextraktes	I. Titration	II. Titration	Summa	Fettspaltung in Proz.
I.	20. VIII. 03	Moses R. 25 Jahre Neurasthenie	Probefrühstück	1 Stde.	100 ccm gut verdauter Rückstände	+	31		44								
a)	22. VIII. 03	„	300 ccm Bouillon mit 2 Eigelb	2 Stdn.	10 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken Nachspülung mit 100 ccm Wasser	+ schwach				100 ccm Spülflüssigkeit	100	5	60 ccm wasserhell	1,85	6,0	7,85	**23,6**
b)	23. VIII. 03	„	„	„	15 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken Nachspülung mit 100 ccm Wasser	+				15 ccm der ausgeh. Rückstände	50	2	35 ccm hellgelb	2,4	15,7	18,1	**13,2**
c)	29. VIII. 03	„	350 ccm Bouillon mit 2 Eigelb	2½ Stdn.	keine Rückstände												
II.	20. VIII. 03	Karl G. 25 Jahre	Probefrühstück	1 Stde.	120 ccm gut verdaut	+	41		58								
a)	21. VIII. 03	„	300 ccm Bouillon mit 2 Eigelb	2 Stdn.	25 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken	+ schwach				20 ccm des Ausgeheberten	50	2	35 ccm hellgelb	1,6	3,5	5,1	**31,4**

b)	23. VIII. 03	„	„	1 1/2 Stdn.	60 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken	+	26		35	„	50	2	„	1,8	6,5	8,3	**21,6**
c)	29. VIII. 03	„	„	2 Stdn.	40 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken	+	60		64	„	50	2	40 ccm hellgelb	1,0	2,6	3,6	**28,3**
III.		Louise Br. Hysterie	Probefrühstück	1 Stde.	110 ccm gut verdaut	+	18	26	39								
a)	19. VIII. 04	„	250 ccm Bouillon, 2 Eier, ein Brötchen	1 Stde.	260 ccm ziemlich gut verdaut einige grobe Amylumbrocken	+	14	39	49	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	40 ccm hellgelb	4,4	11,4	15,5	**25,2**
b)	22. VIII. 04	„	„	1 1/2 Stdn.	240 ccm ziemlich gut verdaut einige grobe Amylumbrocken	+	26	40	51	„	75	2	50 ccm hellgelb	1,5	4,3	5,8	**25,8**
IV.	20. VIII. 03	Marie Ar. 52 Jahre Ptose, Atonie	Probefrühstück	1 Stde.	140 ccm mäßig gut verdaut	+	14		46								
a)	21. VIII. 03	„	300 ccm Bouillon mit 2 Eigelb	2 Stdn.	50 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken	+ schwach				20 ccm des Ausgeheberten	50	2	35 ccm hellgelb	1,8	3,2	5,0	**36,0**
b)	23. VIII. 03	„	„	„	100 ccm Flüssigkeit mit feinen Flocken	+ schwach				„	50	2	„	1,2	3,9	5,1	**23,5**
										20 ccm des Originalfrühstücks	50	2	„				
											Durchschnittswerte:			0,7	17,6	18,3	3,8

Tabelle II.

	Datum	Name	Verabreichte Speise	Verdauungszeit	Durch Ausheberung gewonnene Rückstände	Congo	Acidität: Freie HCl	Acidität: Alizarin	Acidität: Phenolphthalein	Zur Prüfung auf Fettspaltung wurden verwandt:	Menge d. zugegoss. Äthers	Menge d. zugegoss. Alkohols	Menge des abgegossenen Ätherextraktes	I. Titration	II. Titration	Summa	Fettspaltung in Proz.
IV. c)	19. IX. 04	Louise Br. Traumatische Hysterie	5 Eigelb mit Zuckerlösg. auf 500 ccm aufgefüllt	1 Stde.	210 ccm; Emulsion nicht zerstört	+	16	26	38	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm goldgelb	3,6	9,7	13,3	**27,1**
d)	20. IX. 04	„	„	1 1/2 Stdn.	300 ccm Beginnende Zerstörung d. Emulsion	+	18	33	46	„	75	2	50 ccm leicht gelblich	3,4	9,9	13,3	**25,6**
e)	21. IX. 04	„	„	2 Stdn.	200 ccm Beginnende Zerstörung d. Emulsion	+	23	34	44	„	75	2	50 ccm hellgrün	2,0	7,9	9,9	**20,2**
V.	18. IX. 04	Karoline K. 36 Jahre Neurasthenie	Probefrühstück	1 Stde.	90 ccm gut verdaut	+	30	40	50								
a)	19. IX. 04	„	500 ccm Eigelbzuckerlösg.	1 Stde	310 ccm Emulsion erhalten	+	8	15	25	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm goldgelb	3,0	10,4	13,4	**22,0**
b)	20. IX. 04	„	„	1 1/2 Stdn.	300 ccm Emulsion erhalten	+	16	24	35	„	75	2	50 ccm gelb	2,2	6,5	8,7	**25,2**

c)	21. IX. 04	„	„	2 Stdn.	Beginnende Zerstörung d. Emulsion	+	35	42	48	„	75	2	50 ccm hellgrün	2,2	5,1	7,3	**30,2**
VI. a)	1. X. 04	A. Z. gesund. Nach Probefrühstück normale Werte	500 ccm Eigelb-Zuckerlösung	1 Stde.	23 ccm Emulsion erhalten	+	—	—	—	„	75	2	50 ccm tiefgrün	2,2	11,6	13,8	**15,8**
				1½ Stdn.	24 ccm Emulsion erhalten	+	—	—	—	„	75	2	50 ccm grünlich	3,2	10,2	13,4	**23,8**
				2 Stdn.	35 ccm Emulsion unter feiner Gerinselbildung zerstört	+	—	—	—	„	75	2	„	2,3	7,0	9,3	**24,6**
				2½ Stdn.	Keine verwertbare Menge von Rückständen mehr zu erhalten.												
										Durchschnittswerte f. 20 ccm des Originalfrühstücks:				0,8	20,8	21,6	**3,7**
VII.	30. IX. 04	Joseph Kl. stenosierender Pylorustumor. (Zuckerlösg. erbrochen).	Probefrühstück	1 Stde.	150 ccm gut verdaut	+	58	67	78								
a)	1. X. 04	„	300 ccm Bouillon mit 6 Eigelb (6% freie Fettsäure)	1 Stde.	360 ccm gut verdaut	+	63	72	89	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm tiefgrün	3,2	12,7	15,7	**20,1**
b)	5. X. 04	„	„	6 Stdn.	180 ccm gut verdaut	+				„	75	2	50 ccm grün	2,1	15,9	18,0	**11,7**

Aus den Versuchen geht also hervor, daß von den eingeführten Fettmengen im normalen Magen durchschnittlich 24,5 Proz. gespalten wurden, und zwar sind die Werte ziemlich konstant und zeigen keine regelmäßige Abhängigkeit von der Verdauungszeit.

Auch diesem Verfahren haftete jedoch noch als Mißstand an, daß die zutage geförderten Rückstandsmengen oft nicht zur Verarbeitung ausreichten. Zudem war der Fettgehalt der Lösung ein relativ geringer, so daß die Fehlergrenze sehr in die Breite gerückt wurde.

Ich griff deshalb auf die von v. Mering angegebene und auch von Volhard verwandte Eigelbzuckerlösung zurück. (Frühstück bestehend aus 5 Eigelb, die mit einer 14 proz. Traubenzuckerlösung auf 500 aufgefüllt werden.) Der hohe Zucker- und Fettgehalt ließ eine erhebliche Herabsetzung der Motilität und so die Erlangung bequem zu verarbeitender Mengen auch bei längerer Verdauungszeit erhoffen.

Im Verlauf einer großen Reihe von Versuchen bewährte sich diese Modifikation des Frühstücks aufs beste. Der Fettgehalt war ein hinreichend großer, auch beim Achylischen waren nach längerer Verdauungszeit noch hinreichend Rückstände vorhanden, und endlich ließ sich das Fett hier, wie häufige Kontrollversuche ergaben, bequem und zuverlässig extrahieren.

Meine Untersuchungen befaßten sich zunächst wieder mit dem normalsezernierenden Magen, und ich verweise auf Tabelle II.

Diese weiteren, an 3 verschiedenen Versuchspersonen angestellten Versuche erbringen uns also eine Bestätigung unserer ersten Resultate, indem sie eine durchschnittliche Spaltung von 21,6 Proz. in einer und 25 Proz. in 2 Stunden ergeben.

Ich begnüge mich vorläufig damit dieses Ergebnis hervorzuheben, um erst später auf andere Fragen einzugehen.

Mein Programm umfaßte dann weiter eine Prüfung der Fettspaltung bei Störungen der Saftsekretion. Für abnorm hohe HCl-Werte standen mir 2 Fälle (VII und VIII) zur Verfügung, die beide mit einer Spaltung von nur etwa 15 Proz. die von Volhard bereits im Reagensglas gemachte Erfahrung bestätigten, daß abnorm hohe Säurewerte hemmend auf die Fettspaltung einwirken; jedoch sind hierbei wohl auch noch später zu erwähnende Einflüsse der Motilität in Betracht zu ziehen. (Tabelle III.)

Tabelle III.

	Datum	Name	Verabreichte Speise	Verdauungszeit	Durch Ausheberung gewonnene Rückstände	Congo	Acidität: Freie HCl	Acidität: Alizarin	Acidität: Phenolphthalein	Zur Prüfung auf Fettspaltung wurden verwandt:	Menge d. zugegoss. Äthers	Menge d. zugegoss. Alkohols	Menge des abgegossenen Ätherextraktes	I. Titration	II. Titration	Summa	Fettspaltung in Proz.
VIII.	19. VIII. 04	Carl Schw. 40 Jahre Hyperacidität	Probefrühstück	1 Stde.	40 ccm gut verdaut	+	57	63	75								
			Probemahlzeit	3 Stdn.	160 ccm gut verdaut	+	90	106	135								
a)	20. VIII. 04	„	250 ccm Bouillon mit 2 Eigelb	1 Stde.	170 ccm gut verdaut	+	48		79	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm goldgelb	1,3	7,3	8,6	**15,1**
b)	22. VIII. 04	„	„	$1\frac{1}{2}$ Stdn.	45 ccm gut verdaut	+	56		78	„	75	2	„	1,1	6,1	7,2	**15,3**
c)	22. IX. 04	„	500 ccm Eigelbzuckerlösung	1 Stde.	350 ccm, Emulsion zerstört, feine Gerinnsel	+	19	38	54	„	75	2	50 ccm grüngelb	1,7	11,4	12,8	**13,3**
d)	3. X. 04	„	„	2 Stdn.	220 ccm, Emulsion zerstört, feine Gerinnsel	+	34	48	60	„	75	2	„	1,6	7,4	9,0	**17,8**
		Joseph Kl.	(cf. Tabelle II. VII. a u. b)														20,1 11,7

Tabelle IV.

	Datum	Name	Verabreichte Speise	Verdauungszeit	Durch Ausheberung gewonnene Rückstände	Congo	Acidität: Freie HCl	Acidität: Alizarin	Acidität: Phenolphthalein	Zur Prüfung auf Fettspaltung wurden verwandt:	Menge d. zugegoss. Äthers	Menge d. zugegoss. Alkohols	Menge des abgegossenen Ätherextraktes	I. Titration	II. Titration	Summa	Fettspaltung in Proz.
IX.		Ludwig Be. 48 Jahre Hypochylie (Carcinom?)	Probefrühstück	1 Stde.	73 ccm, schlecht verdaut	+ —	3	26	34								
	4. X. 04	„	500 ccm Eigelbzuckerlösung	2 Stdn.	410 ccm, Emulsion nicht zerstört	—				20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm gelb	4,8	5,4	10,2	**47,0**
X.		Joh. Re. 39 Jahre Hypochylie	Probefrühstück	1 Stde.	115 ccm, schlecht verdaut	—	— 7	11	14								
a)	28. IX. 04	„	500 ccm Eigelbzuckerlösung	1 Stde.	500 ccm, Emulsion erhalten. Zähschleimige Masse	—	— 18	62	73	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm hellgrün	8,6	11,5	20,1	**42,7**
b)	3. X. 04	„	„	$1^1/_2$ Stdn.	280 ccm, Emulsion erh. Zähschleimige Masse	—	— 22	14	17	„	75	2	„	3,2	6,5	9,7	**33,0**
c)	4. X. 04	„	„	2 Stdn.	220 ccm, Emulsion erh. Zähschleimige Masse	—				„	75	2	„	3,5	4,0	7,5	**46,7**
XI.		Marie Al. 54 Jahre Achylia gastrica	Probefrühstück	1 Stde.	8 ccm, völlig unverd. Brocken	— Lackmus schwach alkalisch			0								
a)	21. IX. 04	„	500 ccm Eigelbzuckerlösung	1 Stde.	320 ccm, Emulsion erh. Masse zäh,	—	— 45	4	7	20 ccm des Ausge-	75	2	50 ccm	2,7	13,7	16,4	**16,4**

b)	22. IX. 04	"	"	$1^1/_2$ Stdn.	erh. Masse zäh, schleimig	—				Lackmus sauer	"	75	2	"	2,4	9,5	11,9	**20,2**
XII.		Joseph Th. 32 Jahre Achylia gastrica	Probefrühstück	1 Stde.	10 ccm, gänzlich unverdaut	—	—1		3	Lackmus amphoter								
a)	21. IX. 04	"	500 ccm Eigelbzuckerlösung	1 Stde.	250 ccm, Emulsion erhalten. Masse dickflüssig, zäh	—	—45	8	15	Lackmus sauer	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm grün	6,6	7,6	14,2	**46,9**
b)	29. IX. 04	"	"	1 Stde.	380 ccm, Emulsion erhalten. Masse dickflüssig, zäh	—				Lackmus sauer	"	75	2	50 ccm hellgrün	7,2	17,9	25,1	**28,6**
c)	22. IX. 04	"	"	$1^1/_2$ Stdn.	180 ccm, Emulsion erhalten. Masse dickflüssig, zäh	—				Lackmus sauer	"	75	2	50 ccm grün	5,8	8,5	14,3	**40,6**
d)	3. X. 04	"	"	2 Stdn.	160 ccm, Emulsion erhalten. Masse dickflüssig, zäh	—				Lackmus sauer	"	75	2	"	4,4	5,6	10,0	**44,0**
e)	11. X. 04	"	"	1 Stde.	250 ccm, Emulsion erhalten. Masse dickflüssig, zäh	—					"	75	2	50 ccm goldgelb	3,5	4,6	8,1	**43,2**
f)	13. X. 04	"	5 Eigelb mit Wasser verquirlt und auf 500 aufgefüllt	1 Stde.	30 ccm, dicke Emulsion	—					"	75	2	"	1,8	3,0	4,8	**37,5**
XIII.		Marie Na. 32 Jahre Achylia gastrica	Probefrühstück	1 Stde.	16 ccm, völlig unverdaut	—	0		7	Lackmusneutral								
a)	4. X. 04	"	500 ccm Eigelbzuckerlösung	$1^1/_2$ Stdn.	210 ccm, Emulsion erh. Zähe Masse	—				Lackmus sauer	20 ccm des Ausgeheberten	75	2	50 ccm grün	6,5	8,4	14,9	**43,7**
b)	5. X. 04	"	"	2 Stdn.	100 ccm, Emulsion erh. Zähe Masse	—				Lackmus sauer	"	75	2	"	6,7	8,0	14,7	**45,6**

Hatten also seither unsere Ergebnisse mit den Resultaten der theoretischen Versuche einigermaßen im Einklang gestanden, so fanden sich gänzlich unerwartete, überraschende Resultate bei Versuchen an hypo- bzw. achylischen Patienten. Schon Volhard war es aufgefallen, daß der Magen, der keine oder nur sehr wenig freie HCl mehr absondert, bezüglich der Fettspaltung sich wie ein normaler verhält, während die filtrierten Magensäfte von Achylischen keine Fettspaltung aufwiesen. Bei unseren an 5 verschiedenen Patienten angestellten 13 Versuchen resultierten Werte, welche die bei Normalen erzielten durchweg erheblich überschritten: eine Spaltung von durchschnittlich 45,8 Proz. in 2 Stunden. (cf. Tabelle IV.)

Für die Beurteilung der Exaktheit und des positiven Wertes der gesamten Untersuchungen kommt wohl in erster Linie die Frage in Betracht, inwieweit die gewonnenen Resultate durch Faktoren, die sich unserer Einwirkung entziehen (Sekretion, Motilität) beeinflußt werden, und bis zu welchem Grade deren Tragweite unserer Beobachtung zugänglich ist. Einen Anhaltspunkt für die Veränderung in der Konzentration, die die Lösungen im Verlauf der Verdauung erfahren, gewinnen wir durch einen Vergleich des gesamten Fettgehaltes der Stammlösung mit dem einer gleichen Menge der ausgeheberten Rückstände. Die bezüglichen Zahlen lehren, daß die Lösung während der Verdauung einer zum Teil erheblichen Verdünnung unterliegt, und daß diese mit wachsender Verdauungszeit zuzunehmen scheint. Bei der Bouilloneilösung ist die Verdünnung durchweg eine erheblich größere als bei der Eigelbzuckerlösung, eine Tatsache, die zunächst überraschen muß, da man doch annehmen sollte, daß die Zuckerlösung im Gegenteil eine recht erhebliche Wasserausscheidung in den Magen bewirke. Vielleicht findet aber dieses scheinbar widersprechende Verhalten darin seine Erklärung, daß die nach Einführung der Bouillon intensivere Salzsäuresekretion eine schnellere Zerstörung der Emulsion bewirkt. Die Lösung erfährt dann bald eine starke Aufrahmung, und die sich an der Oberfläche abscheidenden Fette werden vorzeitig ausgetrieben. Es entzieht sich also unserer Kenntnis, in welchem Mengenverhältnis die Verdauungsprodukte den Ventrikel verlassen, und damit ergibt sich, daß unsere Versuchsresultate keine absolute Gültigkeit beanspruchen können, sondern nur als Approximativwerte zu nehmen sind. Mit dieser Annahme einer Abrahmung und vorzeitigen Ausstoßung der Fettsäure ließ es sich auch erklären, daß Verdauungszeit und Größe der Fettspaltung nicht in einem regel-

mäßigen Zusammenhang stehen. Die von uns gefundenen prozentischen Werte blieben dann hinter denen der de facto erfolgten Spaltung zurück. So könnte auch das paradoxe Verhalten der Hypo- und Achylien z. T. wenigstens seine Erklärung finden. Hier blieb die Emulsion bestehen, die Fettsäuren verharrten in gleichmäßiger Verteilung und erschienen im Ausgeheberten im richtigen Mengenverhältnis. Die Präponderanz der Spaltung des Achylikers gegenüber der des Normalen wäre somit nur eine scheinbare gewesen. Es gelang auch, diese Hypothese durch den Versuch zu stützen:

Ein Normaler und ein Achyliker erhielten je ein Eigelbzuckerfrühstück. Nach $1^1/_2$ Stunden wurde ausgehebert und die Rückstände wurden in hohen Flaschen im Wasserbad weiter der Verdauung unterworfen. Nach 6 Stunden war beim Normalen eine deutliche Schichtung eingetreten: über einer trüben, wässerigen Flüssigkeit schwamm ein dicker, gelber Rahmzylinder. Die achylischen Rückstände zeigten keinerlei Veränderung. Es wurden nun von beiden Flaschen je 20 ccm aus der obersten Schicht und vom Boden des Gefäßes entnommen und auf Fettspaltung geprüft. Die Werte zeigten, daß beim Normalen eine deutliche Abrahmung stattgefunden hat, während beim Achylischen Fettsäure und Fett vollkommen im gleichen Mengenverhältnis verharrten.

Es blieb nun weiter zu erhoffen, daß sich aus dem Vergleich unserer Versuchswerte mit den aus den anfangs erwähnten Kontrollversuchen gewonnenen Zahlen der Fermenteinheiten des jeweils produzierten Magensaftes ein Urteil über die Brauchbarkeit unserer Resultate gewinnen ließ. Gehen Fettspaltung und Zahl der Fermenteinheiten bis zu einem gewissen Grade parallel, so beweist dies, daß die unseren Versuchen anhaftende Fehlerquelle diese doch nicht in einem Maße beeinflußt, daß den gefundenen Zahlen eine ungefähre Gültigkeit abgesprochen werden könnte.

In Tabelle V sind für eine Reihe von Versuchen die betreffenden Werte zusammengestellt, und in der Tat läßt sich für die normalen Magensäfte eine gewisse Übereinstimmung zwischen Fermentintensität und tatsächlicher Spaltung nicht verkennen. Auch die Tatsache, daß der Hyperacide weniger spaltet, ohne zugleich eine erheblich kleinere Zahl von Fermenteinheiten aufzuweisen, läßt sich durch den hindernden Einfluß der Säure und die schneller erfolgende Abrahmung erklären. Unsere Resultate dürfen also, wenn auch keine absolute, so doch eine approximative Gültigkeit beanspruchen, und im Rahmen einer größeren Serie von Versuchen werden sie als brauchbare Vergleichswerte gelten können.

Voller Widersprüche erscheint aber auch hier wieder das Verhalten der Achylien. Wo wir im Magen eine Spaltung von 44 Proz. in 2 Stunden gefunden hatten, spaltete der durch Filtrat

gewonnene Magensaft nur 3,4 Proz. in 12 Stunden, was etwa der im Eigelb präformierten Fettsäure entspricht. Der normale Magensaft spaltete in derselben Zeit etwa 50 Proz.

Tabelle V.

Name	Saftsekretion	Verdauungszeit Stdn.	Fettspaltung in Proz.	Fermenteinheiten pro ccm
Br.	Normal	1 1½ 2	25,2 25,8 20,2	10,5 14,5 16,9
Ka.	„	1 2	22,0 30,2	12,0 14,1
Kl.	Hyperacid	1	14,1	9,3
Sch.	„	1½ 2	15,3 17,8	8,5 10,5
Re.	Hypochylie	1 2	42,7 46,7	0,48 1,14
Al.	Achylie	1½	20,2	1,43
Th.	„	1	46,9	1,35
„	„	1½ 2	40,6 44,0	1,1 2,9 (?)
Na.	„	1½	43,7	0,72

Das Verhalten der Achylien bedurfte also in zweifacher Hinsicht einer Klärung. Erstlich, wie kommt es, daß bei dem Versagen aller andern Funktionen der Magenverdauung lediglich die Fettspaltung in so weitgehendem Maße bestehen bleibt; und dann, warum ist der spaltende Faktor im Filtrat der ausgeheberten Rückstände unwirksam?

Es lag nahe, den hohen Wert der ersten Titration auf die reichlich vorhandene Milchsäure zu beziehen. Weder das Ätherextrakt des Filtrates, noch eine 2 Stunden im Magen belassene reine Zuckerlösung ergaben jedoch einen ähnlich hohen Titer für freie Säure, und außerdem enthielt eine reine Eigelbwasserlösung, ohne Zuckerzusatz, nach 2stündiger Verdauung einen gleichen Prozentsatz freier Säure. Es hatte also tatsächlich eine Fettspaltung in weitem Umfang stattgefunden, und wenn das Filtrat der Rückstände keine Verdauungsarbeit leistete, so mußte

der spaltende Faktor in den Rückständen selbst in einer das Filter nicht passierenden Form enthalten sein, sich hierin also wesentlich von dem des aciden Magensaftes unterscheiden. Seinen Nachweis erbrachte folgende Versuchsreihe:

Die nach einem Eierfrühstück ausgeheberten Rückstände werden mit mehrfach erneuerten Ätherquanten so lange extrahiert, bis der Aciditätsgrad des abgegossenen Äthers nur noch Spuren beträgt. Der bleibende von Fettsäure und Fett befreite Rest wird bis zur vollkommenen Verdunstung des Äthers im Brutschrank gelassen und dann einer Eigelbwasserlösung zugefügt. Nach 10 stündiger Verdauung ergab sich eine Fettspaltung von etwa 19 Proz., wie aus folgender Tabelle VI hervorgeht.

Tabelle VI.

Versuche bei Achylien	PF: Eigelbzucker-emulsion	I. Titration	II. Titration	Summa	abgespaltene Fettsäure in Prozenten
20 ccm Eigelbwasser	10 ccm Filtrat der ausgeheberten Rückstände	2,1	42,5	44,6	4,7
"	10 ccm der mit Äther extrahierten Rückstände	**7,9**	**33,3**	**41,2**	**19,2**
0	"	0,4	2,5		
20 ccm Eigelbwasser	10 ccm Filtrat der ausgeheberten Rückstände	2,7	42,8	45,5	3,7
"	10 ccm der mit Äther extrahierten Rückstände	8,5	36,2	44,7	19,0
0	"	0,6	3,0		

In einer weiteren Versuchsreihe (Tab. VII) wurde das zeitraubende Verfahren der kontinuierlichen Ätherextraktion dadurch vermieden, daß von einem gewöhnlichen Probefrühstück des Achylischen Filtrat und Filterrückstand in der gewohnten Weise auf Fermentgehalt geprüft wurden: Die Filtrate spalteten kaum, die Rückstände erheblich.

Für den, der noch immer in die Existenz eines fettspaltenden Fermentes im Magen Zweifel setzt, blieb die Annahme übrig, daß die Fettspaltung durch zurückgeflossenen Pankreassaft bedingt sei; zumal konnte beim Achylischen, dem das Stimulans zu einem

Tabelle VII.

Versuche bei Achylien	PF: Semmel-Teeprobe-frühstück	I. Titration	II. Titration	Summa	abgespaltene Fettsäure in Prozenten
20 ccm Eigelbwasser	10 ccm Filtrat	2,7	42,8	45,5	6,9
„	10 ccm Rückstände	8,5	36,2	44,7	**19,0**
0	10 ccm Rückstände	0,6	4,0	4,6	
20 ccm Eigelbwasser	10 ccm Filtrat	2,4	40,8	43,2	5,8
„	10 ccm Rückstände	9,4	33,6	43,0	**21,9**
„	10 ccm Filtrat	2,1	42,5	44,6	4,7
„	10 ccm Rückstände	7,9	33,3	41,2	**23,7**

energischen Pylorustonus fehlt, die Möglichkeit einer derartigen Regurgitation sehr wohl möglich sein. Um diesem Einwand wenigstens für die Fälle von Achylie zu begegnen, prüfte ich bei Rückständen wie beim Filtrat die eiweißverdauende Kraft, indem ich in je 3 Reagensgläsern Mettsche Röhrchen der Verdauung unterwarf a) mit den unveränderten Verdauungssäften, b) nach Zusatz von 2 Proz. Sodalösung bis zur alkalischen Reaktion, c) nach Zusatz von HCl bis zur deutlichen Congoreaktion. (Siehe Tabelle VIII auf S. 19.)

Keiner dieser Versuche scheint also für das Vorhandensein von Pankreasferment zu sprechen, jedoch könnte man gegen eine negative Beweiskraft der Versuche einwenden, daß die Trypsinverdauung durch die Gegenwart des Zuckers zu stark gehemmt werde, oder daß das Trypsin schon unter dem Einfluß der (gegen Lackmus) schwachsauren Reaktion seine Wirksamkeit einbüße.

Dem ersten Einwand begegnet ein Versuch, den ich unter den genannten Bedingungen anstellte mit den Rückständen einer einfachen Eigelbwasserlösung, von der in einer Stunde 39 Proz. gespalten worden waren. Weder das alkalisierte Filtrat, noch der unfiltrierte Rückstand hatten in 12 Stunden Mettsche Röhrchen angegriffen.

Tabelle VIII.

	Hypochylie	kompl. Achylie	kompl. Achylie	kompl. Achylie
Filtrat unverändert	0	0	0	0
Rückstand unverändert	0	0	0	0
Filtrat schwach alkalisch	0	0	0	0
Rückstand schwach alkalisch	0	0	0	0
Filtrat sauer	Nach 12 Stdn. Mett angedaut	0	0	0
Rückstand sauer	„	0	0	0

Auch dem zweiten Einwand kann ich einen Versuch entgegenstellen: Ein Patient der Klinik hatte morgens im nüchternen Magen 40 ccm eines stark gallig gefärbten Sekretes, dessen Gesamtacidität 14 betrug, also wesentlich höher war als die der Achyliker-Rückstände. Hiervon 8 ccm mit 2 ccm einer 2proz. Sodalösung versetzt, zeigten nach 2 Stunden deutliche Eiweißverdauung an Mettschen Röhrchen. Das Trypsin hat sich also der geringen Acidität des Magens gegenüber resistent erwiesen, und es ist nicht einzusehen, warum in unseren Fällen von kompletter Achylie seine Toleranz eine geringere gewesen sein soll.

Schließlich sprach auch die Tatsache der Retention durch das Filter sehr gegen eine pankreatische Natur des Fermentes. Ein Zufall kam mir zu Hilfe und gestattete mir, gerade auf dieses letzte Kriterium einen Beweis dafür zu stützen, daß die Fettspaltung auch beim Achylischen als eine selbständige Funktion der Magenschleimhaut zu nehmen ist:

Patient St. hatte vor einigen Jahren eine schwere Verätzung der Magenschleimhaut durch Schwefelsäure erlitten. Eine sich daran anschließende narbige Pylorusstenose hatte die Gastro-Enterostomie nötig gemacht. Patient hat jetzt eine komplette Achylie mit deutlichem Gallenrückfluß.

Das Probefrühstück, nach $^3/_4$ Stde. ausgehebert, ergibt mäßig verdaute Weckbrocken und reichlich, stark gallig gefärbtes Sekret von alkalischer Reaktion. Mein Kollege Loehlein hatte die Liebenswürdigkeit, das Filtrat auf Pepsin und Trypsin nach der Volhardschen Methode zu prüfen, und er konnte hierbei jenes kaum, dieses in beträchtlicher Menge nachweisen.

Es erwies sich dieser Fall bis dahin als die einzige Achylie, bei der das Filtrat Fett in nennenswerter Weise zu spalten vermochte:

Tabelle IX.

	PF: Eigelbzucker-emulsion		I. Titration	II. Titration	Summa	abgespaltene Fettsäure in Prozenten
20 ccm Eigelbwasser	10 ccm Filtrat	12 Std.	6,6	35,2	41,8	**15,8**
„	10 ccm Rückstände	„	7,2	35,4	42,6	**16,9**

Hätte auch in den übrigen Fällen ein stärkerer Rückfluß von Pankreassekret vorgelegen, so hätte er sich wohl durch das gleiche Verhalten dokumentieren müssen.

Diese Versuche sprechen dafür, daß die im achylischen Magen beobachtete Fettspaltung durch ein besonderes, von der Magenschleimhaut produziertes Ferment bewirkt wird, das sich von dem des normalen Magens durch sein verschiedenes Verhalten gegenüber dem Filter unterscheidet.

Bei der Frage nach der Natur dieses Fermentes gehe ich wohl nicht fehl, wenn ich mich auf gleichzeitig mit den meinen angestellte Versuche meines Kollegen Fromme berufe. Er hat im Glycerinextrakt des Schweinemagens einen sowohl in saurer wie in alkalischer Lösung fettspaltenden Faktor nachgewiesen, der ebenfalls das Filter nicht zu passieren vermochte, und wir sind geneigt, in diesem Zellferment eine Vorstufe des eigentlichen Fermentes, ein Proferment, zu sehen.

Wenn nun auch die bisherigen Versuche gegen einen konstanten Rückfluß von Pankreassaft beim Achylischen sprechen, so bedarf doch die Frage, ob und wie weit an der Fettspaltung im normalen Magen zurückfließender Pankreassaft sich beteiligt, noch weiterer Untersuchung. Ein zwingender Beweis für oder gegen Rückfluß von Pankreasferment ist aus solchen Versuchen nicht eher zu ziehen, als bis die Eigenschaften des Bauchspeichels, z. B. die Empfindlichkeit des Trypsins einerseits, des Steapsins andererseits gegen den Magensaft systematisch geprüft sind.

Für die rein quantitative Frage nach dem Umfang der Fettverdauung im Magen ist es in letzter Linie gleichgiltig, welches Ferment die Umwandlung leistet.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen lassen sich im folgenden zusammenfassen:

1. Im normalen Magen finden sich von einer eingeführten Fettemulsion nach einstündiger Verdauung durchschnittlich 25 Proz. des Fettes gespalten.

2. Dieser sich im Versuch ergebende Wert bleibt hinter dem in Wirklichkeit erreichten wahrscheinlich noch zurück, da Motilität und Sekretion und besonders die im sauren Medium rasch eintretende Abrahmung das Resultat in nicht kontrollierbarer Weise beeinflussen.

3. Ein konstanter Zusammenhang zwischen Verdauungszeit und Größe der Fettspaltung läßt sich, wohl aus denselben Gründen, nicht nachweisen.

4. Beim Hyperaciden ergeben sich geringere Werte für abgespaltene Fettsäure.

5. Im achylischen Magen finden sich nach einer Stunde durchschnittlich 45 Proz. der eingeführten Fette gespalten.

6. Diese Spaltung ist durch ein von der Magenschleimhaut produziertes Ferment bedingt.

7. Das fettspaltende Ferment des Achylischen geht nicht durchs Filter. Es läßt sich in dem trypsinfreien Filterrückstand nach Probefrühstück nachweisen.

8. Die hohen Werte für freie Fettsäure beim Achylischen erklären sich zum Teil aus dem hier gleichmäßigen Bestehenbleiben der Emulsion.

In Dankbarkeit und Trauer gedenke ich meines verstorbenen Chefs, des Herrn Geh. Rat Prof. Dr. Riegel, der meinen Arbeiten stets das liebenswürdigste Interesse entgegen gebracht hat. Herrn Privat-Dozent Dr. Volhard danke ich herzlich für die Überweisung des Themas und mancherlei Unterstützung durch Rat und Tat.

Literatur-Verzeichnis.

v. Mering, Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1897.
Volhard, Münchener med. Wochenschrift 1900, Nr. 5 u. 6.
Marcet, The med. Times and Gazette. New Series 1858, vol. 18, pag. 210.
Cash, Du Bois' Archiv 1880, S. 323.
Ogata, Daselbst 1881, S. 115.
Klemperer u. Scheuerlen, Zeitschr. f. klin. Medizin **15**, 370.
Volhard, Zeitschr. f. klin. Medizin **42**, Heft 5 u. 6 (1901).

Volhard, Daselbst **43**, Heft 5 u. 6.

Volhard, Verhandlungen der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte 1901, **73**, Hamburg.

Volhard, Verhandlungen des 19. Kongresses für innere Medizin in Berlin 1901, Wiesbaden, J. F. Bergmann.

Stade, Diese Beiträge **3**, 7 u. 8 (1902).

Borissow: Aus Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, S. 32; übersetzt v. Walther, Wiesbaden 1898, J. F. Bergmann.

Ellinger, Verhandlungen des 19. Kongresses für innere Medizin in Berlin 1901, Wiesbaden, J. F. Bergmann.

Inouye, Archiv für Verdauungskrankheiten **9**, Heft 3.

Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 22.

Müller, Verhandlungen des 19. Kongresses für innere Medizin in Berlin 1901. Wiesbaden, J. F. Bergmann; und Sitzungsbericht der physikal.-mediz. Gesellschaft zu Würzburg 1902.

V.

Über das fettspaltende Ferment der Magenschleimhaut.

Von Dr. med. **Albert Fromme**, approb. Arzt.

Aus der medizinischen Klinik in Gießen. (Stellvertr. Direktor: Privatdozent Dr. F. Volhard.)

Die Frage, ob im Magen eine Spaltung von Neutralfetten in Fettsäuren und Glycerin in beträchtlicherem Umfange stattfindet, war schon vor mehreren Jahrzehnten Gegenstand der Untersuchung. Eine geringe Spaltung ist von fast allen Autoren beobachtet worden, aber sie schien so geringfügig zu sein, daß man glaubte, sie ausreichend durch Bakterienwirkung erklären zu können. Allerdings war niemals versucht worden, Fett in emulgierter Form in den Magen zu bringen.

Als Volhard[1]) im Jahre 1900 eine Nachprüfung der von Meringschen Methode, mittels einer Eigelbzuckeremulsion die Resorptionsfähigkeit des Magens zu bestimmen, unternahm, machte er die Beobachtung, daß unter Zerstörung der Emulsion eine Spaltung des Fettes in Fettsäuren und Glycerin eintrat. In einer zweiten Abhandlung wies Volhard[2]) die fermentative Natur des fettspaltenden Vorgangs nach und untersuchte in einer dritten Abhandlung[3]) die Eigenschaften dieses Ferments.

Trotz dieser eingehenden Untersuchungen ist die Überzeugung von der Existenz des neuen Ferments, des Magensteapsins, noch keine ganz allgemeine geworden, und selbst in neuen Auflagen einiger Handbücher der Physiologie wird seine Existenz nur unter Vorbehalt zugegeben. Der Grund hierfür mag darin zu suchen sein, daß von anderen Autoren bisher nur von Inouye[4]) eine Nachprüfung des wichtigsten Teils der Volhardschem Versuche erfolgt ist. Jener Autor stellte wie dieser Versuche mit Glycerinextrakten aus der Magenschleimhaut, mit Pawlowschen Saft und auch am lebenden Tiere an, ohne jedoch auch nur einmal eine fettspaltende Wirkung beobachten zu können. Wenn auch

in dieser Arbeit keinerlei Folgerungen aus dem negativen Ausfall der Versuche gezogen werden, wahrscheinlich deshalb nicht, weil diesen negativen Versuchen mit Glycerinextrakten positive, auf ganz ähnliche Art von Volhard ausgeführte Versuche entgegenstehen, so wird doch derjenige, der die Arbeit von Inouye liest, ohne alle positiven Versuche Volhards zu kennen, Zweifel an der Existenz eines fettspaltenden Fermentes im Magen schöpfen.

Es erinnert dies an ähnliche Meinungsverschiedenheiten, die nach Entdeckung des Pankreassteapsins zutage traten. Bekanntlich hat es lange gedauert, bis die Existenz des fettspaltenden Fermentes im Pankreas allgemein anerkannt wurde. Noch im Jahre 1880 hat Roberts[5]) Zweifel an der Existenz des Pankreassteapsins geäußert. Seine Einwände gründeten sich darauf, daß es ihm in keinem seiner Experimente, weder mit auf verschiedene Weise hergestellten Pankreasextrakten, noch mit Pankreasgewebe selbst gelungen war, die Spaltung von Neutralfetten zu beobachten.

Die Arbeit von Inouye gab Veranlassung, die Versuche mit Glycerinextrakten der Magenschleimhaut einer Nachprüfung zu unterziehen, und Herr Dr. Volhard hatte die Liebenswürdigkeit, mich mit der Ausführung dieser Versuche zu betrauen.

Die Versuche mit Extrakten der Magenschleimhaut werden bei der Entscheidung, ob es sich um ein fettspaltendes Ferment im Magen handelt oder nicht, immer ein entscheidenderes Wort mitzusprechen haben, als die Versuche mit ausgehebertem Saft. Denn bei diesen ist die Gefahr nur zu groß, daß es sich um zurückgeflossenen Pankreassaft, der durch die Würgreflexe beim Aushebern möglicherweise in den Magen gelangen kann, handelt. Nur durch besondere Untersuchungen, bei denen zugleich mit der Untersuchung auf Fettspaltung Bestimmungen des Trypsins, das ja mit zurückgeflossen sein müßte, ausgeführt werden, kann bewiesen werden, daß es sich um ein besonderes, für den Magensaft charakteristisches Ferment handelt.

Gegen die beweisende Kraft der Versuche mit Glycerinextrakten der Magenschleimhaut könnte man allerdings verschiedene Einwände erheben. So könnte man einwerfen, es könnte Pankreassteapsin sich in der Magenschleimhaut imbibiert vorfinden.

Schon Volhard hat aber in seiner zweiten Abhandlung über das fettspaltende Ferment den Beweis geliefert, daß dieses Ferment wie das Pepsin und Lab hauptsächlich von den Fundusdrüsen abgesondert wird. In den später folgenden Tabellen wird dieses noch sicherer gezeigt werden, da wir jetzt durch die Erfahrung

gelernt haben, genauer den Pylorusteil von dem Fundusteil zu trennen. Bei meinen Versuchen trat in keinem Fall irgendwie nennenswerte Spaltung durch das Pylorusschleimhautextrakt auf, auch bei solchen Magen nicht, wo der Fundusteil die schönste spaltende Kraft zeigte. Beruhte die spaltende Kraft des Fundusextraktes auf Pankreassaft, der sich in die Schleimhaut imbibiert hat, weshalb sollte denn der Pylorus keine spaltende Kraft zeigen, dessen Schleimhaut doch zuerst von dem zurückfließenden Pankreassaft durchtränkt werden muß?

Ein anderer naheliegender Einwand ist der, daß die Fettspaltung auf Bakterienwirkung beruhe. Dieser Einwand ist schon deshalb nicht haltbar, weil dann mit demselben Rechte das Pylorusextrakt spalten müßte, das immer unter ganz gleichen Bedingungen hergestellt wurde, wie das Fundusextrakt.

Zunächst einiges über die Methode, mittels deren die Fettspaltung geprüft wurde, wie sie von Volhard und Stade[6]) ausgearbeitet und in sehr einfacher Weise zu handhaben ist. Bezüglich hier nicht berührter Einzelheiten sei auf diese Arbeit verwiesen.

Es wurde stets eine Eigelbemulsion (3 Eigelb auf 100 Wasser) und hiervon — abgesehen von einigen Versuchen zu Anfang — 20 ccm für jeden Versuch benutzt. Die stets frisch bereitete Eigelblösung wurde mit dem Glycerinextrakte versetzt, geschüttelt und dann eine bestimmte Anzahl von Stunden im Wasserbade von 40° verdaut. Als Kontrollversuche wurden Eigelb mit Wasser und Glycerinextrakt mit Wasser angesetzt. Nach Ablauf der Verdauungszeit wurden die Verdauungsgemische in kaltem Wasser abgekühlt, dann mit 75 ccm wassergesättigtem Äther und 2 ccm Alkohol übergossen und so lange geschüttelt, bis der oben aufsitzende Äther einen intensiv gelben Farbenton zeigte, ein Beweis, daß Neutralfette wie Fettsäuren in genügender Menge extrahiert waren. Wie Stade nachgewiesen hat, ist es nicht nötig, sämtliche Fette und Fettsäuren quantitativ zu extrahieren, da die Spaltung in Prozenten ausgedrückt wird, und Fette und Fettsäuren stets in gleichem Verhältnis in den Äther übergehen.

Nachdem die oben aufsitzende Ätherschicht klar geworden ist, werden 50 ccm von ihr in ein Erlenmeyersches Kölbchen gegossen, mit 50 ccm säurefreiem Alkohol versetzt, und die freien Fettsäuren gegen Phenolphthalein mit $^1/_{10}$ n-NaOH titriert. Das Gemisch wird in gut verkorkten Gefäßen durch 10 ccm Normalnatronlauge der Verseifung unterworfen, die, wie Stade nachgewiesen hat, in der Kälte in 24 Stunden beendet ist. Durch Zusatz von 10 ccm Normalschwefelsäure beseitigt man den Überschuß an Natronlauge und macht zugleich aus dem verseiften Neutralfett die Fettsäuren frei, die dann durch eine zweite Titration mit $^1/_{10}$ Normalnatronlauge bestimmt werden. Aus den Titrationswerten I und II läßt sich dann leicht die Größe der Spaltung in Prozenten berechnen nach der Formel: $\frac{I \cdot 100}{I + II}$

Die Glycerinextrakte wurden zunächst aus der Schleimhaut von Schweinemagen hergestellt, da diese Arbeit eine Nachprüfung der Inouyeschen Versuche bezweckte, der wie Volhard früher Schweinemagen verwendete. Da bisher keine Erfahrungen darüber vorliegen, ob der Gehalt des Magens an fettspaltendem Ferment von der Nahrungsaufnahme abhängt, so erschien es naheliegend, hier auf die Erfahrungen, die über das fettspaltende Ferment des Pankreas gemacht worden waren, zurückzugreifen. Wie Grützner[7]) gefunden hat, besitzt das Pankreas des Hundes etwa 6 Stunden nach einer reichen Mahlzeit am wenigsten Fettferment. Dann vermehrt sich die Menge bis zur vierzigsten Stunde, sodaß das Pankreas des nüchternen Tieres am reichsten an Fettferment ist. Treffen diese Verhältnisse beim Magen auch zu, so wären die Aussichten, positive Resultate zu erhalten, durchaus nicht ungünstig, da die Schlachttiere, wie mir der Metzger bestätigte, gewöhnlich nüchtern sind. Inwieweit der Umstand Einfluß auf den Gehalt an Ferment hat, ob der Magen sofort verarbeitet wird oder nicht, darüber wird diese Arbeit weiter unten Aufschlüsse geben.

Versuche mit Glycerinextrakten aus Schweinemagenschleimhaut.

Glycerinextrakt I.

Zu dem Versuch wurden 3 Schweinemagen benutzt, die mir etwa 4 Stunden nach der Schlachtung zukamen. Die Schleimhaut wurde abgezogen, Fundus- und Pylorusteil getrennt, und beide fein zerhackt. Die Unterscheidung zwischen Fundus und Pylorus ist leicht, da sich die Pförtnergegend durch eine ausgesprochen gelbe Farbe auszeichnet. Ein Teil der Fundus- wie der Pylorusschleimhaut wurde im Verhältnis 1 : 2 mit Glycerin versetzt und nach Zusatz von einigen Thymolkristallen in den Brutschrank gestellt. Der andere Teil der Fundus- wie Pylorusschleimhaut wurde im Verhältnis 1 : 2 mit destilliertem Wasser versetzt und unter Thymolzusatz der Autolyse im Brutschrank unterworfen. Zu den Verdauungsversuchen wurden meist 10 ccm durch Gaze kolierten Extraktes verwendet.

Die Versuche ergaben die interessante Tatsache (vergleiche Tabelle Ia), daß das Fundusextrakt am zweiten Tage noch keine Spur von spaltender Kraft zeigte, daß am fünften Tage zum ersten Male Spaltung auftrat, die dann vom siebenten Tage an eine so starke war, daß während einer Verdauungszeit von 6 Stunden bis zu 33 Prozent des Fettes gespalten wurden. Die Tabelle zeigt weiter, daß das gekochte Fundusglycerinextrakt unwirksam ist, wie das nicht anders zu erwarten war. Die Tabelle Ia enthält am Schluß einige Kontrollversuche, die beweisen, daß das Glycerinextrakt keine in den Äther übergehende Säuren enthält.

Die Tabelle Id gibt die negativen Versuchsergebnisse mit dem Pylorusglycerinextrakt wieder. Wir erhalten durch diese Versuche

eine schöne Bestätigung der schon früher von Volhard geäußerten Ansicht, daß wie die übrigen Magenfermente so auch das fettspaltende Ferment fast ausschließlich von dem Fundusteil abgesondert wird. Zugleich wird durch diese Tatsache, wie schon erwähnt, auf sehr einfache Weise der natürlichste Einwand, den man erheben könnte, daß nämlich die Spaltung durch Bakterien erfolge, widerlegt, da gar kein Grund vorhanden ist, weshalb der Pylorusteil, der in ganz derselben Art und Weise behandelt wurde, nicht auch durch Bakterien die Fähigkeit, Fette zu spalten, erhalten haben sollte.

Da der Fermentgehalt des Fundusglycerinextraktes I jetzt deutlich erwiesen war, wurde das ganze Extrakt durch Gaze koliert, die Kolatur dann ruhig im Laboratorium stehen gelassen. Die Schleimhaut wurde wiederum im Verhältnis 1:2 mit Glycerin versetzt. Wir hofften auf Grund von Erfahrungen, wie sie am Pankreas gemacht worden sind, daß das neu aufgegossene Glycerin imstande sein würde, wiederum neues Ferment zu extrahieren. Wie Liversidge[8]) gezeigt hat, müssen, um zerkleinertes Pankreas ganz von diastatischem Ferment zu befreien, große Mengen Glycerin 14 Monate lang damit in Berührung sein. In der Tat zeigte dieser zweite Glycerinaufguß bereits am dritten Tage (Tabelle Ib) eine spaltende Kraft, die die des ersten beinahe erreichte. Er wurde deshalb sofort wieder koliert und die Schleimhaut aufs neue im Verhältnis 1:2 mit Glycerin versetzt. Auch dieser Aufguß (Tabelle Ic) zeigte schon am vierten Tage, wenn auch sehr geringen, so doch ganz deutlichen Fermentgehalt, der langsam zunahm.

Versuche mit dem Autolysat.

Das Autolysat zeigte keinerlei Fäulniserscheinungen. Die Erwartungen, die wir an diese Versuchsanordnung knüpften, wurden in jeder Beziehung getäuscht, der Erfolg war ein ganz negativer. (Tabelle II.) Es gingen zwar ganz geringe Mengen Säure in den Äther über, aber weder wurde die Azidität des Ätherextraktes mit der Zeit eine stärkere, noch war irgend ein Unterschied zwischen Fundus- und Pylorusteil zu konstatieren. Dieser negative Ausfall war um so überraschender, als dieselbe Schleimhaut verwandt wurde, die mit Glycerin übergossen ein wirksames Extrakt lieferte. In der Annahme, daß das Ferment in Wasser unlöslich sei, wurde der Versuch gemacht, die Schleimhautstückchen selbst auf das Fett wirken zu lassen, aber auch bei dieser Versuchsanordnung war keine Steigerung der Fettspaltung zu beobachten. Die Aussicht, jetzt noch das Ferment zu extrahieren, war nach diesen Versuchen eine sehr geringe. Trotzdem wurde noch der Versuch gemacht, durch Glycerin, das ja auch aus denselben Schleimhäuten das Ferment extrahiert hatte, einen Erfolg zu erzielen.

Das Wasser wurde abfiltriert und die Schleimhautstückchen mit Glycerin übergossen. Außerdem wurde ein Teil der Schleimhaut 48 Stunden

Tabelle I.

Versuche mit dem Glycerinextrakt I; bereitet aus der Schleimhaut von 3 Schweinemagen.

Versuchsanordnung	Wievielter Tag	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
Ia.	Fundusglycerinextrakt, I. Aufguß.					
25 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	2. Tag	6	1,3	nicht verseift		
33 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	5. Tag	6	7,75	52,65	60,4	12,8
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	7. Tag	6	20,8	41,2	62,0	33,0
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt gekocht	7. Tag	6	1,6	44,0	45,6	3,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt filtriert	17. Tag	13	1,6	46,7	48,3	3,4
	Kontrollversuche.					
10 ccm Fundusglycerinextrakt + 20 H_2O	—	6	0,5	2,9	—	—
10 ccm Fundusglycerinextrakt + 20 H_2O	—	6	0,6	nicht verseift		
Ib.	II. Glycerinaufguß nach 7tägiger Extraktion.					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	3. Tag	5	9,0	37,2	46,2	19,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	6. Tag	$7\frac{1}{2}$	13,7	34,8	48,5	28,5
Ic.	III. Glycerinaufguß nach 13tägiger Extraktion.					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	4. Tag	14	1,9	30,0	31,9	5,9
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	5. Tag	15	3,2	46,5	49,7	6,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	8. Tag	16	4,7	61,8	66,5	7,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	21. Tag	24	5,4	42,7	47,1	11,4
Id.	Pylorusglycerinextrakt.					
25 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	2. Tag	6	3,0	nicht verseift		
33 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	5. Tag	6	2,8	57,0	59,8	4,6
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	7. Tag	6	2,8	59,4	62,2	4,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	17. Tag	14	3,3	54,0	57,3	5,7

Tabelle II.

Versuche mit dem Autolysat, bereitet aus 3 Schweinemagenschleimhäuten [Dieselben wie in Tab. I]

Versuchsanordnung	Anzahl der Tage nach dem Herstellen	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
II a. Fundusautolysat.						
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	1. Tag	4	2,9	44,8	47,7	6,1
25 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	4. Tag	6	3,9	Keine Verseifung		
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	6. Tag	6	2,5	Keine Verseifung		
30 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat mit Schleimhaut	8. Tag	6	2,8	42,6	45,4	6,0
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat mit Schleimhaut	15. Tag	5	3,0	45,6	48,6	6,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Glycerinextrakt aus der zur Autolyse angesetzten Schleimhaut	15. Tag	5	3,2	47,1	50,3	6,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Glycerinextrakt aus dem Fundusautolysat (28 Stunden Brutschrank)	17. Tag	14	2,6	54,0	56,6	4,6
II b. Pylorusautolysat.						
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	1. Tag	4	2,6	47,8	50,4	5,1
25 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	4. Tag	6	3,5	Keine Verseifung		
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat	6. Tag	6	3,05	Keine Verseifung		
30 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat mit Schleimhaut	8. Tag	6	2,8	47,3	50,1	5,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Autolysat mit Schleimhaut	15. Tag	5	3,7	56,7	60,4	6,1
10 ccm Glycerinextrakt aus dem Pylorus-Autolysat mit Schleimhaut + 20 ccm Eigelb	15. Tag	5	3,2	47,1	50 3	6,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Glycerinextrakt des Pylorus-Autolysats (48 St. Brutschrank)	17. Tag	14	2,8	53,2	56,0	5,0

mit Glycerin im Brutschrank extrahiert. Wie ebenfalls aus Tabelle II hervorgeht, war auch hierbei der Erfolg negativ. Es blieb keine andere Annahme übrig, als daß das Ferment durch die Autolyse zerstört war, ein deutlicher Beweis dafür, wie empfindlich dieses Ferment ist, empfindlicher wie die übrigen, zum Beispiel das Pepsin, da das Fundusautolysat gute peptische Kraft zeigte.

Glycerinextrakt II.

Zu diesen Versuchen wurden zwei Schweinemagen benutzt, Fundus- und Pylorusteil wiederum getrennt behandelt. Mit Rücksicht auf die beim Pankreas gemachte Erfahrung, nach der fettspaltende Kraft besser beobachtet wurde, wenn das Pankreas erst einige Zeit der Wirkung des Luftsauerstoffs ausgesetzt war, wurde der Versuch gemacht, auch beim Magen auf diese Weise eine stärkere Fettspaltung und vielleicht auch einen früheren Eintritt derselben zu erzielen.

Die Magen wurden zuerst, nachdem sie ausgewaschen waren, 24 Stunden im Laboratorium liegen gelassen, dann wurde die Schleimhaut abgezogen und zerhackt und dann weitere 24 Stunden der Luft ausgesetzt. Dann erst wurde Glycerin übergegossen und zwar wiederum im Verhältnis 1 : 2. Die Extrakte wurden dann nach Thymolzusatz in den Brutschrank gestellt und nun, im Anfang täglich, an dem durch Gaze kolierten Extrakte geprüft, ob und wann die fettspaltende Wirkung eintrat.

Bezüglich der Resultate sei auf Tabelle IIIa verwiesen. Wider Erwarten zeigte dieses Extrakt überhaupt keine fettspaltende Kraft. Wäre die Ursache der Fettspaltung auf Bakterienwirkung zurückzuführen, so hätte dieses Glycerinextrakt die bei weitem stärkste Wirkung zeigen müssen, da 48 Stunden vergangen waren, bevor die Schleimhaut mit dem an und für sich schon etwas antiseptischen Glycerin und dann noch mit Thymol versetzt wurde.

Glycerinextrakt III.

Anschließend daran seien hier die Ergebnisse mitgeteilt, die mit einem dritten Extrakte erzielt wurden, das genau wie Glycerinextrakt I aus der Schleimhaut von zwei Schweinemagen am Abend des Schlachttages bereitet wurde. Man sieht aus den Resultaten, die in Tabelle IIIc zusammengestellt sind, sehr schön, wie das Extrakt zuerst keine fettspaltende Kraft zeigte, die sich dann aber immer mehr entwickelte, um vom sechsten Tage an erhebliche Fettspaltung zu ergeben.

Versuche mit Glycerinextrakten aus der Hundemagenschleimhaut.

Da bisher die Versuche, Fettspaltung mit Glycerinextrakten zu prüfen, immer mit Schweinemagen ausgeführt waren, die, wie eben gezeigt, manchmal negative Resultate ergeben, so haben wir

Tabelle III.

Versuchsanordnung	Glycerinextrakt II.					
	Wieviel Tage extrahiert	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
III a.	Fundusglycerinextrakt					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	1 Tag	6	1,8	40,6	42,4	4,2
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	2 Tage	6	1,9	48,9	50,8	3,7
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	3 Tage	5	1,7	37,2	38,9	4,7
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	4 Tage	5	2,5	56,4	58,9	4,2
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	5 Tage	5	2,1	46,4	48,5	4,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	6 Tage	14	2,7	54,2	56,9	4,7
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	12 Tage	15	1,9	48,0	49,9	3,8
III b.	Pylorusglycerinextrakt					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	1 Tag	6	1,5	38,6	40,1	3,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	3 Tage	5	1,6	46,1	47,7	3,3
III c.	Glycerinextrakt III [nur vom Fundus bereitet]					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	1 Tag	18	2,2	48,8	51,0	4,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	2 Tage	15	3,4	46,7	50,1	6,7
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	4 Tage	15	3,8	nicht verseift		
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	5 Tage	16	4,8	60,0	64,8	7,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	6 Tage	16	6,6	37,4	44,0	15,0
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	8 Tage	14	7,3	53,0	60,3	12,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	23 Tage	36	22,2	28,8	51,0	43,5

weiter einige Versuche mit Glycerinextrakten aus der Hundemagenschleimhaut angeschlossen:

Glycerinextrakt I.

Der Magen eines ganz kurz vorher bei einem Versuche gestorbenen Hundes wurde sofort, und zwar, da die Schleimhaut sich nicht gut abziehen ließ, samt der Muskulatur fein zerhackt und dann im Verhältnis 1 : 2 mit Glycerin übergossen, unter Thymolzusatz in den Brutschrank gestellt. Der Mageninhalt des Hundes wurde ebenfalls entnommen, der Gehalt an freier Salzsäure durch Zusatz von $^1/_{10}$ Normalnatronlauge soweit verringert, daß er noch 25 freie Salzsäure betrug (da wie Volhard nachgewiesen hat, eine zu hohe Acidität die Fettspaltung verhindert), die Flüssigkeit filtriert, und 10 ccm des Filtrats mit 20 ccm Eigelb 6 Stunden im Wasserbade von 40° der Verdauung unterworfen. In 6 Stunden wurden 21,6 Proz. des Fettes gespalten. (Vergl. Tabelle IVa.)

Schon nach 12 Stunden hatte das Glycerin aus der Schleimhaut soviel Ferment extrahiert, daß bei einer Verdauungszeit von 14 Stunden über 50 Proz. des Fettes gespalten wurden (cf. Tab. IVb). Am zweiten Tage wurde das Extrakt koliert und neues Glycerin aufgegossen, das nach 4 Tagen wieder neues Ferment enthielt. Auch ein dritter Glycerinaufguß vermochte noch weiter Ferment zu extrahieren (cf. Tab. IVb).

Glycerinextrakt II.

Die Schleimhaut dieses Hundemagens wurde 12 Stunden auf Eis liegen gelassen, um zu versuchen, ob auch das Ferment des Hundemagens eben so leicht wie das des Schweinemagens vernichtet würde. Das Extrakt wurde dann auf dieselbe Weise wie die anderen hergestellt. Wie aus Tabelle IVc hervorgeht, zeigte das Extrakt schon am ersten Tage eine spaltende Kraft, die nicht geringer wie die des ersten Extraktes war, eine Schädigung des Fermentes war also nicht eingetreten.

Meine Erfahrungen aus den Versuchen mit den Glycerinextrakten aus der Schweinemagenschleimhaut lassen sich in folgendem zusammenfassen: Das fettspaltende Ferment des Schweinemagens ist wie das des Pankreas das bei weitem empfindlichste, es wird sehr leicht zerstört, sodaß man nicht aus jeder Schleimhaut ein wirksames Extrakt erwarten kann. Es wird schon durch Einwirkung der atmosphärischen Luft leicht geschädigt oder zerstört. Es wird auch, wenn man die Schleimhaut in Wasser der Selbstverdauung überläßt, vernichtet. Es dauert meist mehrere Tage, bis das Ferment in das Glycerin übergeht, sodaß man aus negativ ausgefallenen Versuchen in den

Tabelle IV.

Versuchsanordnung	Wieviel Tage extrahiert	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
IV a.	Hundemagensaft					
10 ccm Hundemageninhalt, filtriert, Acidität durch Alkalizusatz auf 25 freie HCl reduziert + 20 ccm Eigelb	—	6	13,3	36,3	49,6	26,1
IV b.	Glycerinextrakt I.					
10 ccm Extrakt + 20 ccm Eigelb	12 Stdn.	14	37,5	29,0	66,5	56,4
	Zweiter Glycerinaufguß nach 2 tägiger Extraktion.					
10 ccm Extrakt + 20 ccm Eigelb	4 Tage	25	15,6	45,2	60,8	25,6
	Dritter Glycerinaufguß nach 7 tägiger Extraktion					
10 ccm Extrakt + 20 ccm Eigelb	16 Tage	36	8,5	41,2	49,7	17,3
IV c.	Glycerinextrakt II.					
10 ccm Extrakt + 20 ccm Eigelb	1 Tag	15	28,7	25,2	53,9	53,2
5 ccm Extrakt + 20 ccm Eigelb	2 Tage	15	21,8	26,6	48,4	44,1

ersten Tagen nicht auf das Fehlen des Fermentes schließen darf. Endlich ist hier noch einer Tatsache Erwähnung zu tun, die bei den später folgenden Versuchen zur Prüfung des Zeitgesetzes gefunden wurde: Das Glycerinextrakt des Schweinemagens ist filtriert unwirksam. Dasselbe Glycerinextrakt, das imstande war, in 6 Stunden bis zu 33 Proz. des Fettes zu spalten, erwies sich nach Filtration als völlig unwirksam, es wurden in 14 Stunden nur 3,4 Proz. gespalten, ein Resultat, das gleich war dem mit gekochtem Extrakt erzielten!

Nach diesen Erfahrungen könnte das negative Resultat von Inouyes Versuchen möglicherweise in folgendem begründet sein. Inouye gibt bei Wiedergabe seiner Versuche mit den Glycerinextrakten nur einmal an, daß der Magen sofort nach dem Schlachten verarbeitet wurde. Sind die Schweinemagen nicht ganz frisch, so wird man immer längere Zeit, als es Inouye tat, und zwar am besten im Brutschrank extrahieren müssen, um das Ferment zu erhalten. Aus der Inouyeschen Abhandlung geht nicht hervor, ob das Glycerinextrakt filtriert worden ist, sodaß man nicht entscheiden kann, ob vielleicht auch hierin das negative Resultat begründet sein könnte. Nur bei dem Versuche mit wässeriger Infusion ist bemerkt worden, daß koliert wurde. Mit einem Wasserextrakt aber haben auch wir kein Resultat erzielt.

Man wird also bei Versuchen über das fettspaltende Ferment des Magens mit seiner großen Empfindlichkeit — im Gegensatz zu den anderen Magenfermenten — zu rechnen haben, man wird es in dieser Eigenschaft auf eine Stufe mit dem Pankreassteapsin stellen können, und bei noch so großer Exaktheit bei der Bereitung der Extrakte scheint außerdem, um positive Resultate zu erzielen, noch die Mitwirkung bisher unbekannter günstiger Umstände, d. h. etwas Glück, nötig zu sein. Ist doch auch bei Versuchen, die z. Z. in hiesiger Klinik von Engel ausgeführt werden, lange nicht bei allen Pankreasglycerinextrakten eine fettspaltende Wirkung erzielt worden!

Prüfung des Zeitgesetzes.

In seiner III. Abhandlung hatte Volhard versucht, mit Glycerinextrakten die Gültigkeit des Schütz-Borissowschen Gesetzes auch für das Magensteapsin zu zeigen. Dieses Gesetz, das, wie bekannt, besagt, daß sich die Mengen der Verdauungsprodukte nicht wie die Fermentmengen, sondern wie die Quadratwurzeln aus diesen verhalten, ist von Volhard und Stade nach Versuchen mit menschlichem Magensaft dahin erweitert worden, daß bei

Tabelle V.

Prüfung des Zeitgesetzes.

Versuchsanordnung	Verdauungs-zeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.	Berechnung nach Schütz-Borissow Proz.
Va.	Erster Versuch.					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	2	3,4	39,7	43,1	7,8	Mittel 7,3
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	4	3,3	45,2	48,5	6,8	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	4	5,9	48,0	52,9	10,9	10,22
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	8	6,2	46,9	53,1	11,6	
Vb.	Zweiter Versuch.					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	3	3,8	46,9	50,7	7,5	
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	6	3,7	43,3	47,0	7,8	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	6	11,3	35,9	47,2	23,9	
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	9	7,4	39,9	47,3	15,6	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	9	15,6	33,7	49,3	31,6	
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	12	7,3	38,5	45,8	15,9	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	12	18,7	21,0	38,7	48,3	
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	24	18,7	26,6	45,3	41,2	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	24	27,4	21,5	48,9	55,6	
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	48	28,7	19,8	48,5	59,1	

gleichen Fermentmengen die Mengen der Verdauungsprodukte sich verhalten, wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Dieses Gesetz wollte ich nun mit Glycerinextrakten nachprüfen. (Sämtliche folgenden Versuche wurden, wenn nicht anders bemerkt, mit dem ersten und zweiten Glycerinaufguß des Extraktes I angestellt.)

Ein Vorversuch schien dieses Gesetz sehr schön zu bestätigen (Tabelle Va). Ein in etwas größerem Umfange angesetzter Versuch aber (Tabelle Vb) ließ eine Übereinstimmung mit dem Gesetz absolut nicht erkennen.

Vielmehr schien es, wenn man von einzelnen Versuchszahlen, die ganz aus der Reihe fielen, absah, eher, daß die Spaltung bei gleichen Fermentmengen sich nicht wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten, sondern wie die Zeiten selbst verhielten. Es fiel bei weiteren Versuchen außerdem auf, daß z. B. die Prozente der in 6 Stunden abgespaltenen Fettsäuren zwischen 13 und über 30 Proz. schwankten, selbst bei Versuchen, die am gleichen Tag und unter gleichen Verhältnissen angestellt worden waren.

Es fragte sich nun, woher diese Differenzen kamen. Zunächst wurde versucht, ob vielleicht das sehr dickflüssige Extrakt mit dem zu verdauenden Eigelb sich nur schwer vermischt, d. h. ob durch stärkeres Schütteln des Verdauungsgemisches eine stärkere Spaltung erzielt werden konnte. In der Tat zeigte sich innerhalb gewisser Grenzen eine Abhängigkeit von der Intensität des Schüttelns (Tabelle VIa). Um die großen Differenzen zu erklären, war dies jedoch nicht ausreichend.

Es konnten ferner, da das Eigelb nie vollständig von dem Eiweiß gereinigt werden kann, die Unterschiede von etwa mehr oder weniger zurückgebliebenem Eiweiß herrühren. Hier zeigte sich nun die überraschende Tatsache, daß Eiweißzusatz die Fettspaltung um über das Doppelte erhöhte (Tabelle VIb). Ja, es konnte sogar das Glycerinextrakt II, das, wie vorher erwähnt, nie spaltende Kraft in stärkerem Maße gezeigt hatte, durch Eiweißzusatz zu zwar geringen, aber doch deutlichen Spaltungen gebracht werden. Wie sich später herausstellte, beruhte diese Beschleunigung der Spaltung lediglich auf dem im Eiweiß enthaltenen Alkali; die Beschleunigung fiel weg, wenn dieses vorher durch Säure neutralisiert wurde (Tabelle VIc), und wurde auch erreicht, wenn ungefähr ebensoviel Alkali, wie im Eiweiß enthalten ist, zugesetzt wurde.

Eine weitere Möglichkeit, die in Erwägung gezogen wurde, um die verschieden stark spaltende Kraft des Extraktes zu erklären, war die, daß vielleicht die vorhandene Glycerinmenge nicht ausreiche, um das Ferment in Lösung zu erhalten. Es wurde deshalb mit stärkeren Verdünnungen des Extraktes zu arbeiten

Tabelle VI.

Versuchsanordnung	Datum	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
VI a. Die Stärke der Fettspaltung erweist sich innerhalb gewisser Grenzen abhängig vom Schütteln des Extraktes mit dem Eigelb.						
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt ganz kurz geschüttelt	19. II.	6	7,1	44,2	51,3	13,8
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt 5 Sek. gesch.	„	„	7,1	45,2	52,3	13,6
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt 10 Sek. gesch.	„	„	9,2	44,6	53,8	15,2
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt 20 Sek. gesch.	„	„	9,6	43,1	52,7	18,2
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt 30 Sek. gesch.	„	„	7,9	48,4	56,3	14,0
VI b. Zusatz von Eiweiß wirkt stark beschleunigend auf die Fettspaltung.						
20 ccm Eigelb + 20 ccm Eiweiß	24. II.	18	1,8	56,0	57,8	3,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	21. II.	7 1/2	13,7	34,8	48,5	28,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt + 20 cm Eiweiß	„	„	22,2	23,2	45,4	46,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	22. II.	13	9,8	39,0	48,8	20,0
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt + 20 ccm Eiweiß	„	„	19,9	29,3	49,3	40,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusextrakt (3. Glycerinaufguß von I.)	28. II.	16	4,7	61,8	66,5	7,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusextrakt + 20 ccm Eiweiß	„	„	11,5	54,3	65,8	17,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusextrakt II (der noch keine deutlich spaltende Kraft gezeigt hatte, cf. Tab. III) mit Schleimhaut + 20 ccm Eiweiß	1. III.	16	4,3	38,0	42,3	10,1
VI c. Der Einfluß des Eiweißes beruht auf dessen Alkaligehalt.						
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusglycerinextrakt III	3. III.	14	7,3	53,3	60,3	12,1
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusglycerinextrakt III + 20 ccm Eiweiß, dessen Alkali durch Säure bis zu schwach saurer Reaktion neutralisiert war	„	„	5,7	55,5	61,2	9,3

versucht. Dabei zeigte sich (Tabelle VIIa), daß vermehrter Glycerinzusatz einerseits die Extraktion mit Äther erschwerte, weshalb zweimal extrahiert wurde, daß aber andrerseits der Glycerinüberschuß auch die Spaltung ganz erheblich hinderte.

Es war endlich daran zu denken, daß das fettspaltende Ferment bei reichlicher Gegenwart der Spaltungsprodukte eine reversible Wirkung besitzen könne, — daher auf Fettsäuren und Glycerin im Sinne einer Synthese zu wirken vermöge, wie dies von anderen Fermenten nachgewiesen ist. Es wurde deshalb ein größeres Quantum Eigelb stark verdaut, das Verdauungsgemisch dann halbiert, der eine Teil titriert, während der andere unter Glycerinzusatz wieder ins Wasserbad gestellt wurde. Hierbei zeigte sich aber, daß die Spaltung, wenn sie begonnen hat, weiter geht (Tabelle VIIb), daß das Glycerin also nur den Beginn der Spaltung verhindert.

Einen Hinweis zur Erklärung der verschieden stark spaltenden Kraft der Extrakte gab uns folgender Versuch: 10 ccm Glycerinextrakt wurden mit 90 ccm destillierten Wassers versetzt und dann in der Kälte stehen gelassen, es bildete sich sofort ein feiner, weißer Niederschlag, der sich am folgenden Tag zu Boden gesetzt hatte. Die Vermutung, daß in diesem Niederschlag auch die Fermente enthalten seien, lag nahe; in der Tat zeigte das Filtrat keine fettspaltende Kraft (cf. Tabelle VIIc).

Nun wurde das Glycerinextrakt selbst filtriert. Daß auch hier das Filtrat die Wirksamkeit verloren hatte, ist schon mitgeteilt worden. So erklärt sich, warum keine für das Zeitgesetz passenden Werte gefunden wurden; das Ferment befand sich in dem Glycerin gar nicht in Lösung.

Versuche zur Überführung von Zellferment in Saftferment.

Volhard hatte schon in seiner III. Abhandlung die Vermutung ausgesprochen, daß das im Glycerinextrakt vorhandene Ferment das Pro- oder Zellferment ist. Er hatte nämlich gefunden, daß das Ferment des Glycerinextraktes außerordentlich empfindlich gegen Salzsäure ist, während durch geringen Alkalizusatz die Fettspaltung eher beschleunigt wurde. Gerade umgekehrt verhielt sich der Magensaft selbst. Während hier das Ferment durch Alkali leicht zerstört wurde, verhielt es sich zugleich relativ resistent gegen Salzsäure. Aus diesem widersprechenden Verhalten, das zugleich Analogien zu dem Verhalten der anderen Magenenzyme zeigte, schloß Volhard nach dem Beispiele Langleys[9]) für das Pepsin, daß auch das fettspaltende Ferment ein Zymogen besitze,

Tabelle VII

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
VIIa. Einfluß von vermehrtem Glycerinzusatz auf die Fettspaltung. (Hindert die Spaltung im Beginne, zugleich die Extraktion mit Äther.)					
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt + 10 ccm Glycerin	13	5,0	18,8	20,8	—
nochmals Extraktion mit 50 ccm Äther, Titration	—	3,2	33,9	37,4	—
Summe	—	5,5	52,7	58,2	9,4
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt + 20 ccm Glycerin	13	3,2	9,7	12,9	—
nochmals Extraktion mit 50 ccm Äther, Titration	—	3,3	45,2	48,5	—
Summe	—	6,5	54,9	61,4	10,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt + 20 ccm Glycerin	14	1,5	19,7	21,2	—
nochmals Extraktion mit 50 ccm Äther, Titration	—	2,1	33,9	36,0	—
Summe	—	3,6	53,6	57,2	6,3
20 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt	13	9,8	39,9	48,8	20,0
VIIb. Das Fortschreiten der Spaltung wird durch Glycerinzusatz nicht gehindert.					
40 ccm Eigelb + 10 ccm Extrakt, davon wird die Hälfte nach der Verdauung extrahiert und titriert	38	11,5	28,2	39,7	28,9
Die andere Hälfte wird mit 20 ccm Glycerin weiter verdaut	24	18,0	24,4	42,2	42,4
VIIc. Das Filtrat ist unwirksam.					
20 ccm Eigelb + Filtrat von 10 ccm Glycerinextrakt + 90 ccm dest. Wasser	$7^1/_2$	1,4	44,8	46,2	3,0

Tabelle VIII.

VIIIa. Versuche mit Trockensubstanz der Schweinemagenschleimhaut (Chem. Fabrik Rhenania, Aachen).

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
20 ccm Eigelb + 2 g Trockensubstanz, kurz geschüttelt	6	5,75	23,8	29,3	19,4
20 ccm Eigelb + 2 g Trockensubstanz, 1/2 Min. geschüttelt	6	11,4	31,2	42,6	26,7
20 ccm Eigelb + 2 g Trockensubstanz, 5 Min. geschüttelt	6	18,0	36,7	54,7	32,9

Versuche, das Ferment der Trockensubstanz in Lösung zu bringen, daß es ein Filter passiert.

VIIIb. 2,5 g Trockensubstanz + 50 H_2O, verrieben, dicke zähe Masse, die nicht filtriert, Fäulnis.

VIIIc. 5 g Trockensubstanz + 100 ccm Glycerin, verrieben, filtriert sehr schwer, keine Fäulnis.

20 ccm Eigelb + 15 ccm Filtrat (nach 3 Tagen)	5	1,6	44,8	46.4	3,3
20 ccm Eigelb + 15 ccm Filtrat (nach weiteren 3 Tagen)	14	2,0	51,9	53,9	3,7
20 ccm Eigelb + 12 ccm Filtrat (nach weiteren 5 Tagen)	18	1.9	50,5	52,4	3,6

VIIId. 5 g Trockensubstanz + 15 ccm 1/10 n-HCl + 20 Eiweiß + 65 H_2O. 24 Stdn. Extraktion im Wasserbad von 40°. Filtration.

20 ccm Eigelb + 15 ccm Filtrat	20	2,6	45,3	47,9	5,4
20 ccm Eigelb + Filterrückstand	20	25,1	19,8	44,9	55,9

das in dem Glycerinextrakte enthalten sei. Eine größere Resistenz des Propepsins und Prochymosins gegen Alkali wurde allerdings kürzlich von Glaeßner[10]) bestritten. Um nicht zu präjudizieren, sprechen wir vielleicht besser von einem Zellferment statt von Proferment, da es schon dieselben fermentativen Eigenschaften wie das Ferment besitzt. Zudem fehlt auch noch der Nachweis, daß sich der Magensaft vom Schwein wie der des Menschen verhält.

Es wurde nun versucht, das Zellferment durch bestimmte Agentien in das Saftferment umzuwandeln, bzw. das Zellferment löslich zu machen.

Diese Versuche wurden zum Teil mit einer von der Chemischen Fabrik Rhenania in Aachen hergestellten Trockensubstanz aus der Schweinemagenschleimhaut ausgeführt, die in erheblichem Maße fettspaltende Kraft besaß (Tabelle VIIIa). Die Stärke der Spaltung war hier, da es sich um ein Pulver handelt, noch mehr wie bei dem Glycerinextrakt abhängig von der Intensität des Schüttelns mit dem Eigelb.

Die Trockensubstanz wurde immer mit dem betreffenden Agens, das zur Lösung verwendet werden sollte, intensiv in einer Reibschale verrieben, manchmal dann noch eine bestimmte Zeit im Wasserbade von 40° extrahiert.

Zunächst wurde versucht, das Zellferment mit Wasser löslich zu machen. Dieser Versuch scheiterte schon daran, daß die Trockensubstanz mit Wasser versetzt eine so zähe Masse darstellte, daß, ehe noch eine wesentliche Filtration stattgefunden hatte, Fäulnis eingetreten war. (Tabelle VIIIb.)

Die Aussicht, mit Glycerin das Ferment in Lösung bzw. im Filtrat zu erhalten, war nach den Erfahrungen mit dem Glycerinextrakte eine geringe, trotzdem wurde auch hier der Versuch wiederholt, die Trockensubstanz wurde mit dem Glycerin intensiv verrieben und dann filtriert. Die Filtration ging sehr langsam von statten, und immer erst nach einigen Tagen war soviel Filtrat vorhanden, daß ein Versuch angestellt werden konnte. Es trat keine Fäulnis auf. Wie Tabelle VIIIc zeigt, wurde auch hier keine Fettspaltung durch das Filtrat beobachtet.

Die schon früher dargelegte Beschleunigung der Fettspaltung durch Eiweiß hätte darauf beruhen können, daß durch Eiweiß das Zellferment löslich gemacht würde, es wurde deshalb versucht, das Zellferment durch Eiweiß mit etwas Salzsäurezusatz zur Lösung zu bringen. Auch dieser Versuch war vergeblich. Während das Filtrat Fette nicht spaltete, hatte der Filterrückstand stark spaltende Kraft. (Tabelle VIIId.)

Die Versuche, das Zellferment des Glycerinextraktes löslich zu machen, sind bisher ebenfalls fehlgeschlagen. (Tabelle IXa.) Es gelang weder mit gekochtem Magensaft — bei ungekochtem wären die Fehlerquellen zu schwer auszuschließen gewesen — noch mit einer verdünnten Salzsäurelösung, noch mit Eiweiß.

Tabelle IX.

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
IX a. 20 ccm Glycerinextrakt + 80 ccm gekochter Magensaft, dessen Azidität 25 freie HCl beträgt, 24 Stdn. Extraktion im Brutschrank, Filtration.					
50 ccm Filtrat + 20 ccm Eigelb	18	3,3	65,7	69,0	4,8
20 ccm Glycerinextrakt + 55 H_2O + 25 $^1/_{10}$ n-HCl. 24 Stdn. Extraktion im Brutschrank, Filtration.					
50 ccm Filtrat + 20 ccm Eigelb	18	3,1	65,1	68,2	4,5
20 ccm Glycerinextrakt + 20 ccm Eiweiß + 60 H_2O, 24 Stdn. im Brutschrank, Filtration.					
30 ccm Filtrat + 20 ccm Eigelb	18	1,8	41,8	43,6	4,1
IX b. Einfluß von Alkali auf die Fettspaltung durch Glycerinextrakte.					
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt	16	4,3	61,0	65,3	6,8
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt + 2,0 $^1/_{10}$ n-NaOH	„	11,1	53,8	64,9	17,1
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt + 4,0 $^1/_{10}$ n-NaOH	„	14,6	54,8	69,4	21,0
20 ccm Eigelb + 5 ccm Extrakt + 6,0 $^1/_{10}$ n-NaOH.	„	4,9	60,5	65,4	7,5
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusglycerin-Extrakt III (mit Schleimhaut)	16	6,6	37,4	44,0	15,0
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusglycerinextrakt III (mit Schleimhaut) + 2,0 $^1/_{10}$ n-NaOH	„	15,4	27,5	42,9	34,9
20 ccm Eigelb + 10 ccm Fundusglycerinextrakt III (mit Schleimhaut) + 4,0 $^1/_{10}$ n-NaOH	„	16,9	26,7	43,0	38,7
IX c. Einfluß von Alkali und Säure auf die Fettspaltung durch die Trockensubstanz.					
0,5 g Trockensubstanz + 20 Eigelb	24	9,1	39,0	48,1	18,7
0,5 g Trockensubstanz + 20 Eigelb + 2,0 $^1/_{10}$ NaOH	„	35,2	12,0	47,2	74,6
0,5 g Trockensubstanz + 20 Eigelb + 4,0 $^1/_{10}$ NaOH	„	29,0	13,6	42,6	68,0
0,5 g Trockensubstanz + 20 Eigelb + 2,0 $^1/_{10}$ HCl	„	14,0	36,2	50,2	27,9
0,5 g Trockensubstanz + 20 Eigelb + 4,0 $^1/_{10}$ HCl	„	6,2	41,0	47,2	13,1

Mit besserem Erfolge gelang es mit Hilfe von Alkali das Zellferment der Trockensubstanz zur Lösung zu bringen. Die Versuche mit Alkali wurden aus folgendem Grunde unternommen: Der Niederschlag, der bei Wasserzusatz zu dem Glycerinextrakt in der Kälte entsteht, löst sich teilweise durch Alkalizusatz. Versuche, die mit Alkali gemacht wurden, um die Resistenz des Proferments gegen dieses nochmals zu prüfen, zeigten (Tabelle IXb), daß es nicht nur gegen bestimmte Alkalimengen unempfindlich ist, sondern daß sogar die Fettspaltung in erheblichem Maße durch Alkalizusatz bei dem aus dem Schweinemagen hergestellten Extrakt befördert wird. Erst bei einem Alkaligehalt von etwa 20 $^1/_{10}$ Normalnatronlauge auf 100 Verdauungsgemisch fällt diese Beschleunigung weg, eine neue Bestätigung der Annahme, daß es sich in diesem Glycerinextrakte um ein von dem im Magensafte enthaltenen verschiedenes Ferment handeln muß, da dieses gegen Alkali äußerst empfindlich ist. Die Trockensubstanz aus der Schweinemagenschleimhaut zeigte dasselbe Verhalten gegen Alkali wie das Glycerinextrakt, durch geringe Alkalimengen konnte eine dreifache Beschleunigung der Fettspaltung erzielt werden, während schon ein geringer HCl-Gehalt die Spaltung schädigte (cf. Tabelle IXc).

Durch Versetzen von Trockensubstanz mit ganz geringen Alkalimengen gelang es in der Tat, das Zellferment in Lösung zu bringen und teilweise zu filtrieren. Ließ man das Alkali aber längere Zeit im Wasserbade einwirken, so war das Filtrat unwirksam, das Ferment war geschädigt worden (Tabelle X).

Bei allen Versuchen mit Natronlauge wurde nach der Verdauung vor der Extraktion eine äquivalente Menge HCl zugesetzt.

Schließlich wurden noch ähnliche Versuche mit Salzsäure angestellt, um eine filtrierbare Lösung des Zellferments zu gewinnen, und zwar im Hinblick auf die Fähigkeit der Salzsäure, andere Profermente des Magens in die Fermente überzuführen, obgleich die bekannte Empfindlichkeit des Zellfermentes des Schweinemagens die Aussicht, so ein Resultat zu erhalten, gering erscheinen ließ.

Es wurden äußerst kleine Mengen Salzsäure zu den Versuchen angewendet. Es zeigte sich, daß bei Steigerung des Salzsäuregehaltes innerhalb gewisser Grenzen eine Steigerung der fettspaltenden Kraft des Filtrates auftritt, daß aber andrerseits eine außerordentlich starke Herabsetzung der fettspaltenden Kraft des Filterrückstandes eintritt. Filtrat und Filterrückstand verhalten sich also nur annähernd reziprok (cf. Tabelle XI). Das Zellferment

Tabelle X.

Filtration mit Natronlauge (sofort filtriert).

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.	
0,5 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 1,0 $^1/_{10}$-NaOH 10,5 ccm Filtrat + 4,5 ccm H_2O + 20 ccm Eigelb	22	2,7	47,2	49,9	5,4	Neutralisation durch $^1/_{10}$-HCl
0,5 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 2,0 $^1/_{10}$-NaOH 11,0 ccm Filtrat + 4,0 ccm H_2O + 20 ccm Eigelb	22	6,2	44,3	50,5	12,2	
0,5 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 4,0 $^1/_{10}$-NaOH 12,0 ccm Filtrat + 3,0 ccm H_2O + 20 ccm Eigelb	22	12,9	40,0	52.9	24,4	
0,5 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 8,0 $^1/_{10}$-NaOH 14 ccm Filtrat + 1,0 ccm H_2O + 20 ccm Eigelb	22	5,8	43.0	48,8	11,9	

Filtration nach Digestion mit Natronlauge.

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration	II. Titration	Summe	in Proz.	
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 4,0 $^1/_{10}$-NaOH 14 Stunden im Wasserbade, dann filtriert: 14 ccm Filtrat + 20 ccm Eigelb	15	3,8	51,0	54,8	6,9	Neutralisation durch $^1/_{10}$-HCl
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 5,0 $^1/_{10}$-NaOH 14 Stunden im Wasserbade, dann filtriert: 15 ccm Filtrat + 20 ccm Eigelb	15	4,0	49,7	53,7	7,4	

Tabelle XI.

Verschiedenes Verhalten von Filtrat und Filterrückstand gegen Salzsäure.

Filtrate							Filterrückstände						
Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespalt. Fettsäuren in Proz.	Bemerkungen	Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration: Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespalt. Fettsäuren in Proz.	Bemerkungen
2 g Trockensubstanz + 40 H_2O + 2,0 $^1/_{10}$-H Cl 33 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	24	3,5	56,4	59,9	5,8	0,5 freie H Cl	Filterrückstand mit H_2O abgespritzt + 20 ccm Eigelb	24	16,3	41,1	57,4	28,4	Die Trockensubstanz setzt sich im Wasserbade zu Boden; daher die geringe Spaltung
2 g Trockensubstanz + 40 H_2O + 4,0 $^1/_{10}$-H Cl 35 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	24	3,3	54,6	57,9	5,5	1,0 freie H Cl	Filterrückstand mit H_2O abgespritzt + 20 ccm Eigelb	24	11,2	47,3	58,5	19,1	
2 g Trockensubstanz + 40 H_2O + 6,0 $^1/_{10}$-H Cl 37 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	24	4,7	54,2	58,9	7,9	1,5 freie H Cl	Filterrückstand mit H_2O abgespritzt + 20 ccm Eigelb	24	9,4	48,0	57,4	16,3	
2 g Trockensubstanz + 40 H_2O + 8,0 $^1/_{10}$-H Cl 38 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	24	4,7	51,2	55,9	8,4	2,0 freie H Cl	Filterrückstand mit H_2O abgespritzt + 20 ccm Eigelb	24	7,8	42,1	49,9 *)	15,6	*) 40 ccm Fettäther
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 2,0 $^1/_{10}$-H Cl 15 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	36	3,8	50,0	53,8	7,1	1,0 freie H Cl	Filterrückstand ohne Wasserzusatz + 20 ccm Eigelb	36	41,1	4,0	45,1	91,1	
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 4,0 $^1/_{10}$-H Cl 16 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	36	2,7	23,5	26,2 *)	10,3	2,0 freie H Cl *) 30 ccm Fettäther	Filterrückstand ohne Wasserzusatz + 20 ccm Eigelb	36	18,5	3,6	22,1 *)	83,6	*) 30 ccm Fettäther
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 6,0 $^1/_{10}$-H Cl 16 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	36	3,2	19,4	22,2 *)	14,1	3,0 freie H Cl *) 30 ccm Fettäther	Filterrückstand ohne Wasserzusatz + 20 ccm Eigelb	36	12,2	40,5	52,7	23,1	
1,0 g Trockensubstanz + 20 H_2O + 8,0 $^1/_{10}$-H Cl 17 ccm Filtr. + 20 ccm Eigelb	36	4,8	33,3	38,1 *)	12,6	4,0 freie H Cl *) 40 ccm Fettäther	Filterrückstand ohne Wasserzusatz + 20 ccm Eigelb	36	9,2	43,4	52,6	17,4	

Tabelle XII.

Verschiedenes Verhalten des Schweine- und Hundemagenfermentes gegen Alkali und Säure.

Versuchsanordnung	Verdauungszeit Stdn.	I. Titration	II. Titration	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Durch Ferment abgespaltene Fettsäuren in Proz.
a) Verhalten des Schweinemagenfermentes (III. Glycerinaufguß des Extraktes I.)					
10 ccm Extrakt + 20 Eigelb	24	5,4	42,7	47,1	11,4
" " + 1,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	10,8	38,7	49,5	21,8
" " + 2,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	13,6	35,4	49,0	27,7
" " + **4,0 $^1/_{10}$ NaOH**	"	15,7	35,1	50,8	**30,9**
" " + 8,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	5,5	47,7	53,2	10,3
" " + **1,0 $^1/_{10}$ HCl**	"	3,6	45,0	48,6	**7,4**
" " + 2,0 $^1/_{10}$ HCl	"	2,7	48,1	50,9	5,3
" " + 4,0 $^1/_{10}$ HCl	"	2,2	49,2	51,4	4,3
" " + 8,0 $^1/_{10}$ HCl	"	1,9	49,6	51,5	3,7
b) Glycerinextrakt I aus Hundemagen, verdünnt im Verhältnis 1 : 2 mit Glycerin.					
10 ccm Extrakt + 20 Eigelb	12	18,7	25,5	44,2	42,3
" " + 1,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	19,5	25,7	45,2	43,1
" " + **2,0 $^1/_{10}$ NaOH**	"	20,2	25,6	45,8	**44,1**
" " + **4,0 $^1/_{10}$ NaOH**	"	1,2	17,6	18,8*	**6,3**
" " + 8,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	0,8	12,8	13,6**	5,8
" " + **1,0 $^1/_{10}$ HCl**	"	19,0	26,9	45,9	**41,4**
" " + 2,0 $^1/_{10}$ HCl	"	18,0	24,8	42,8	42,0
" " + 4,0 $^1/_{10}$ HCl	"	13,2	17,3	30,5	43,2
" " + **8,0 $^1/_{10}$ HCl**	"	15,5	26,0	41,5	**37,3**
c) II. Glycerinaufguß des Hundemagens.					
10 ccm Extrakt + 20 Eigelb	24	16,8	37,1	53,9	31,1
" " + 1,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	18,1	37,0	55,1	32,8
" " + 2,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	19,2	36,9	56,1	34,2
" " + **4,0 $^1/_{10}$ NaOH**	"	8,3	46,3	54,6	**15,2**
" " + 8,0 $^1/_{10}$ NaOH	"	2,4	56,8	59,2	4,0
" " + **1,0 $^1/_{10}$ HCl**	"	17,1	39,1	56,2	**30,4**
" " + 2,0 $^1/_{10}$ HCl	"	16,1	36,6	52,7	30,5
" " + 4,0 $^1/_{10}$ HCl	"	16,7	38,7	55,4	30,0
" " + **8,0 $^1/_{10}$ HCl**	"	15,7	40,0	55,7	**28,1**

* 30 ccm Fettäther. ** 25 ccm Fettäther.

des Filterrückstandes wird dabei stärker geschädigt, als die fettspaltende Kraft des Filtrates zunimmt.

Um auch das Verhalten des Glycerinextraktes von Hundemagen genauer festzustellen, wurde seine Resistenz gegen Alkali und Säure geprüft. Das Zellferment des Schweinemagens kann in schwacher alkalischer Lösung, wie schon erwähnt, seine größte Wirksamkeit entfalten, während es schon durch geringe Salzsäuremengen geschädigt wird. (cf. Tabelle XIIa.) Umgekehrt verhält sich das Ferment des Hundemagenextraktes. Schon bei geringem Gehalt an Natronlauge wird es unwirksam, während es sich resistent gegen Salzsäure erweist (cf. Tabelle XIIb u. c), es verhält sich also gerade so wie das Ferment des menschlichen Magensaftes. Vielleicht ist dabei der Umstand von Einfluß, daß der Hund sich auf der Höhe der Verdauung befand.

Zusammenfassung.

Es ist durch unsere Versuche aufs neue bewiesen, daß die Magenschleimhaut ein fettspaltendes Ferment enthält.

Die Magenschleimhauttrockensubstanz von der Firma Rhenania-Aachen besitzt ein sehr kräftiges Fettspaltungsvermögen.

Auch Hundemagenschleimhaut liefert ein sehr wirksames Glycerinextrakt.

Das Ferment läßt sich aus der Schweinemagenschleimhaut mit Glycerin extrahieren, das Extrakt ist aber erst nach mehrtägiger Extraktion wirksam; dieselbe Schleimhaut liefert nach Abgießen des ersten Extraktes ein zweites und ein drittes Extrakt von kräftigem Fettspaltungsvermögen. Dies gilt nur vom Fundusteil der Schleimhaut, der Pylorusteil enthält kein fettspaltendes Ferment.

Das Ferment des Schweinemagens — sowohl das des Glycerinextraktes wie der Trockensubstanz — verhält sich gegen Säure und Alkali anders als das Ferment des menschlichen Magensaftes. Alkali begünstigt die Fettspaltung, Säure hebt sie auf.

Das Zellferment der Schleimhaut ist in Wasser nicht löslich, auch das des Glycerinextraktes passiert das Filter nicht.

Das Ferment des Hundemagenglycerinextraktes ist gegen Alkali empfindlich, gegen Säure nicht, verhält sich also anders wie das des Schweinemagens und ähnlich dem des menschlichen Magensaftes.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Privatdozent Dr. Volhard für Überweisung des Themas und die

freundliche Unterstützung durch Rat und Tat bei Ausführung der Arbeit herzlichst zu danken.

Literaturverzeichnis.

1) Volhard, Münchener med. Wochenschrift 1900, Nr. 5 u. 6.

2) Volhard, Zeitschr. f. klin. Medizin **42**, Heft 5 u. 6 (1901).

3) Volhard, Daselbst **43**, Heft 5 u. 6.

4) Inouye, Archiv für Verdauungskrankheiten 1902.

5) Gamgee, Chemie der Verdauung. Lehrbuch, übersetzt von Asher und Beyer. Leipzig, Deuticke 1897.

6) Stade, Untersuchungen über das fettspaltende Ferment des Magens. Diese Beiträge **3**, Heft 7 u. 8.

7) Grützner, Notizen über einige ungeformte Fermente des Säugetierorganismus. Pflügers Archiv **12**, 302.

8) Liversidge, On the amylolytic Ferment of the Pancreas. Journal of Anatomy and Physiologie **8**, 23.

9) Langley, Journal of Physiology **3**, 269.

10) Karl Glaeßner, Über die Vorstufen der Magenfermente. Diese Beiträge **1**.

VI.

Über das Zeit- und Fermentgesetz des Pankreassteapsins.

Von Dr. med. **Hans Engel**, approb. Arzt.

Aus der medizinischen Klinik in Gießen. (Stellvertr. Direktor: Privatdozent Dr. F. Volhard.)

I. Einleitung.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung, welche ich auf Anregung und unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Volhard unternommen habe, war die, festzustellen, ob die Fettspaltung durch das Pankreassteapsin in einer ähnlich gesetzmäßigen Weise verläuft, wie dies für andere Fermente nachgewiesen worden ist. Schütz[1]) und unabhängig von ihm Borissow[2]) haben angegeben, daß sich die Verdauungsprodukte des Pepsins proportional den Quadratwurzeln aus den angewandten Fermentmengen verhalten.

Dieses Gesetz, welches unter dem Namen der Schützschen oder Schütz-Borissowschen Regel bekannt ist, wurde von Schütz und Huppert[3]) dahin erweitert, daß für die sekundären Albumosen bei der Pepsinverdauung ein ähnliches gesetzmäßiges Verhalten auch bezüglich der Verdauungszeit besteht, d. h., daß sich jene verhalten wie die Quadratwurzeln aus dem Produkt von Verdauungszeit mal Fermentmenge.

Das gleiche Gesetz fanden Volhard[4, 5, 6]) und Stade[7]) für das fettspaltende Ferment des Magens, und am Schlusse dieser Arbeit findet sich eine Versuchsreihe, welche dieses Gesetz für den neutralisierten Magensaft in ausgezeichneter Weise bestätigt.

Das gleiche Gesetz, daß sich die Verdauungsprodukte verhalten wie die Quadratwurzeln aus dem Produkt f. t, konnte Volhard[8]) bei seiner titrimetrischen Pepsinbestimmung konstatieren.

Es leuchtet ohne weiteres ein, daß jede exakte quantitative Fermentbestimmungsmethode ausgehen muß von dem Wirkungsgesetz des betreffenden Fermentes, ganz abgesehen von dem theoretischen Interesse, welches diese eigentümliche Regel, nach

welcher anscheinend viele hydrolytische Fermentreaktionen verlaufen, bietet.

Wenn dieses Gesetz $v = k\sqrt{f \cdot t}$ richtig ist, bzw. auch auf das Pankreassteapsin zutrifft, so müssen bei gleicher Verdauungszeit die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Fermentmengen, bei gleichen Fermentmengen müssen sich die Verdauungsprodukte verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Wenn beide variieren, so müssen sich die Verdauungsprodukte verhalten wie die Quadratwurzeln aus dem Produkt f.t, mit anderen Worten, es muß für ein und denselben Saft der Quotient $\frac{v}{\sqrt{f \cdot t}}$ konstant sein.

Im folgenden sind nach jeder der drei Prüfungsmöglichkeiten Versuche angestellt worden, welche eine Bestätigung dieses Gesetzes auch für das Pankreassteapsin ergeben.

II. Methodik.

Die angewandte Methode war die von Volhard und Stade ausgearbeitete, wie sie auch von Zinßer und Fromme in den voraufgehenden Arbeiten benutzt wurde: I. Titration eines aliquoten Teiles (50 ccm) des Ätherextraktes nach Zusatz von 50 ccm Alkohol, Verseifung mit 10 ccm n-NaOH und Zerlegung der Seifen nach 24 Stunden durch 10 ccm n-H_2SO_4. II. Titration zur Ermittelung der durch Verseifung gewonnenen Fettsäuren und Berechnung der durch das Ferment abgespaltenen Prozente Fettsäure nach der Formel $I : I + II = x : 100$, $x = \frac{I \cdot 100}{I + II}$.

Als Fett wurde ausschließlich Eigelb in wässeriger Emulsion verwendet. Ich darf bezüglich aller Einzelheiten der Methode auf die vorgenannten Arbeiten verweisen.

Nur in einem unwesentlichen Punkt sah ich mich im Verlauf meiner Versuche zu einer Änderung veranlaßt. Stade hatte bei der Ausschüttelung mit Äther zum Zweck rascherer Schichtung je 2 ccm Alkohol absol. zugefügt und in einer Reihe von Versuchen nachgewiesen, daß dieser geringe Zusatz von Alkohol irrelevant ist für die Summe der ausgeschüttelten Säuren, daß also in Alkohol lösliche Säuren wie die Glycerinphosphorsäure dadurch nicht in den Äther übergehen. Auch ich hatte bei Vorversuchen mit Magensaft (cf. Versuchsreihe IX und X) immer rasches Absetzen des Äthers beobachtet. Ganz im Gegensatz dazu sah ich bei meinen Versuchen mit Pankreasferment beim Ausschütteln mit Äther und 2 ccm Alkohol eine auffallende Neigung zur Bildung von Emulsionen, die sich schon bei vorsichtigem Schütteln leicht bildeten und oft selbst nach 8tägigem Stehen nur geringe Schichtung zeigten, sodaß ein Abgießen des Fettäthers unmöglich war. Auch bei sehr vorsichtigem Schütteln, bei dem dann andrerseits nur ein Bruchteil der Fette und Fett-

säuren in den Äther überging und außerordentlich kleine und ungleiche Summen der Titrationswerte resultierten, ließ sich die Bildung solcher Emulsionen nicht vermeiden, die immer die Ursache eines großen Zeitverlustes wurden. Nach vielen vergeblichen Bemühungen versuchte ich es mit einer Steigerung der hinzugefügten Alkoholmenge, und fand, daß dadurch die Ausschüttelung mit Äther ganz wesentlich erleichtert und die Emulsionsbildung verhindert wird. Daß dadurch keine Fehlerquelle in die Methode gebracht wird, beweisen die folgenden Versuche. (Versuchsreihe I.) Übrigens ergab sich bei Ausschüttelungsversuchen, die ich in 100 ccm-Mensuren anstellte, daß der Alkohol vollständig in das wässerige Verdauungsgemisch geht, wenigstens sobald dessen Menge mehr als das 3 fache des zugefügten Alkohols beträgt.

Versuchsreihe I.

Versuchsanordnung: 90 ccm einer Eigelbemulsion (3 : 100) werden in einem Fläschchen mit einer Messerspitze Pankreatin („absolut") geschüttelt und im Wasserbad 4 Stunden lang der Verdauung ausgesetzt; dann bei 0° abgekühlt, zur Wiederherstellung der etwas zerstörten Emulsion abermals stark geschüttelt; alsdann werden je 20 ccm mit der Pipette in 4 Fläschchen übertragen, mit je 20 ccm Wasser aufgefüllt und wie gewöhnlich mit 50 ccm wassergesättigtem Äther ausgeschüttelt und zwar 1 und 3 mit, 2 und 4 ohne Zusatz von je 10 ccm Alkohol. Wasserbad bei 40°.

Nr.		1. Titration	2. Titration	Summe	Proz. abgesp. Fettsäure
1	mit Alkohol	14,3	30,2	44,5	32,1
2	ohne Alkohol	10,1	22,0	32,1!	31,6
3	mit Alkohol	13,6	30,1	43,9	31,5
4	ohne Alkohol	9,6	19,8	29,4!	32,7

Es fällt auf, daß in den ohne Alkohol ausgeschüttelten Gemischen die Summen der extrahierten Fette viel kleiner sind als in Versuch 1 und 3. Es ist dies auf ungenügende Extraktion infolge vorsichtigen Schüttelns (zur Vermeidung der Emulsionsbildung) zurückzuführen. Daß diese ebenso wenig, wie der Alkoholzusatz auf das Endergebnis von Einfluß ist, beweisen die gut übereinstimmenden Werte in der letzten Kolumne.

III. Ausgangsmaterial und Vorversuche.

In erster Reihe war die Frage nach der Art und Anwendungsweise eines wirksamen fermenthaltigen Agens zu erledigen. Zunächst glaubte ich nur mit klaren Lösungen des Fermentes arbeiten zu dürfen, da nur von diesen eine ganz gleich- und gesetzmäßige Wirkungsintensität erwartet werden konnte. Daß dies nicht so unbedingt der Fall ist, zeigen die späteren Versuche mit Aufschwemmungen des käuflichen Pankreatins.

Das nächstliegende war die Verwendung von Auszügen aus frischen, event. — den übereinstimmenden Angaben über die tryptische Wirksamkeit solcher Auszüge entsprechend — 24 Stunden an der Luft gelegenen Drüsen;

die Befürchtung, daß mit dem Glycerin, als dem einen resultierenden Spaltungsprodukt, ein störender Faktor im Sinn einer Hemmung der Fermentwirkung eingeführt werde, erwies sich später als unbegründet. Jedenfalls war er für mich eine Veranlassung, gleichzeitig mit Chloroformwasserauszügen zu arbeiten.

Ich ging in der Weise vor, daß ich 1 bis 3 Organe halbierte. Die eine Hälfte wurde zerhackt, mit Sand fein zerrieben, wiederum zu zwei gleichen Teilen abgewogen, einerseits sofort mit der doppelten Menge Glycerin, andrerseits mit ebensoviel Chloroformwasser der Brutofentemperatur ausgesetzt. Die andere Hälfte der Organe wurde nach 24stündigem Liegen an der Luft in gleicher Weise behandelt. Nach 2 mal 24 Stunden wurden dann zum ersten Mal Proben entnommen, filtriert und durch einen Vorversuch auf ihre fettspaltende Wirkung geprüft. Gewöhnlich handelte es sich um Proben von 10,0 bis 20,0 ccm. Aber bei einer ganzen Reihe von Auszügen (sowohl Glycerinextrakten als Autolysaten) vermißte ich jedwede fettspaltende Wirkung; offenbar war das sehr empfindliche Steapsin von vornherein (durch die Autolyse?) zerstört, oder während der Extraktion zu Grunde gegangen. Übrigens führt die Empfindlichkeit des Steapsins erfahrungsgemäß sehr häufig zu derart negativen Resultaten. So sagt Neumeister (Lehrbuch der physiol. Chemie), daß die Steapsinwirkung in Glycerinextrakten der Drüse erfahrungsgemäß meistens vermißt werde. Erst nach wiederholten vergeblichen Versuchen erhielt ich einmal ein positives Resultat. 36 Stunden an der Luft gelegene Drüsen wurden zerrieben und der Brei geteilt. Die eine Hälfte wurde zur Herstellung des Trockenpankreas nach Kühne zunächst bis zur völligen Entwässerung mit täglich gewechseltem Alkohol, darauf wiederholt mit Äther extrahiert, an der Luft getrocknet; es resultierten 28,0 g Trockensubstanz. Von dieser wurden ein Teil mit Glycerin (250 g), der andere mit 250 ccm Chloroformwasser 2 mal 24 Stunden lang extrahiert. Von der anderen Hälfte der zerriebenen Drüsen wurde je ein gleicher Anteil frisch in der vorher beschriebenen Weise mit Glycerin bzw. Chloroformwasser extrahiert, und zwar der erstere Anteil ebenfalls 2 mal 24 Stunden. Das Autolysat befand sich schon nach 6 Stunden im Zustand hochgradigster Fäulnis. Die übrigen drei Extrakte wurden koliert und je 50 ccm filtriert; sodann wurde mit je 20 ccm ein typischer Verdauungsversuch angesetzt.

Übrigens sah ich späterhin davon ab, die Extrakte zu benutzen, da ich auf anderem Wege zu viel wirksameren Anwendungsformen gelangte. Ich hatte — zwar zunächst vergeblich — versucht, aus dem käuflichen, von der Chem. Fabrik Rhenania hergestellten und als „absolut“ bezeichneten Pankreatin wirksame wässerige Lösungen 1,0:100,0 herzustellen. Es löste sich zwar ein ganz kleiner Anteil, aber die gewonnene schwache wässerige Lösung zeigte bei 6stündigen Versuchen mit Mengen bis zu 10 ccm keine irgend nennenswerte fettspaltende Wirkung. Auch durch 24stündiges Digerieren des Präparats mit 0,2 und 0,4prozentiger, mit Chloroform gesättigter Sodalösung erhielt ich keine Fermentlösung von bemerkenswert höherer Wirksamkeit. Daß das Präparat an sich nicht unwirksam sei, bewiesen mir dagegen Versuche mit kleinen Mengen des trockenen Präparats. (Vgl. Versuchsreihe II.) Als ich später statt 1,0 g mit 100 Wasser, 4 bis 6 g mit 100 Wasser demselben Verfahren unterwarf, erhielt ich sehr rasch (d. h. ohne längere Digestion) Lösungen von immerhin bemerkenswerter, wenn auch schwacher Wirksamkeit. Dagegen

gelang es mir mit Glycerin (6 g Pankreatin auf 250 Glycerin) schon nach 24stündiger Digestion und übrigens auch ohne diese, eine sehr wirksame, das Filter passierende Lösung herzustellen. Daß Aufschwemmungen eine bedeutende Wirksamkeit zeigten, war nach den Versuchen mit dem trockenen Präparat von vornherein zu erwarten.

Alle folgenden Versuche sind teils mit einer Glycerinlösung, teils mit Aufschwemmungen des käuflichen „absoluten“ Pankreatins (Fabrikat der Rhenaniawerke-Aachen) angestellt. Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Wirksamkeit bei dieser Versuchsanordnung, die insbesondere für die Aufschwemmung wegen der zu befürchtenden Sedimentierung, für das Glycerinextrakt wegen eines eventuell hemmenden Einflusses des Glycerins bei größeren Konzentrationen nicht außer Zweifel stand, waren zunächst die folgenden Versuchsreihen notwendig, die zugleich der Orientierung über die anzuwendenden Mengen des Ferments dienten.

Versuchsreihe II.

Versuchsanordnung: 2,0 g Pankreatin werden mit 260 H_2O und etwas Thymol eine Nacht im Brutschrank belassen. Nach 16 Stunden hat sich das Pankreatin zum Teil abgesetzt; von dem Sediment wird der übrige noch stark getrübte, eine feine Aufschwemmung darstellende Anteil abgegossen und zu dem Versuch benutzt; je 5mal 10 ccm werden in 6 Fläschchen mit je 25 g einer Eigelbemulsion (6 : 200) zusammengebracht, 3 davon werden mit Wasser auf 50 aufgefüllt, 3 andere, Nr. IV, V, VI dagegen mit 5,0, 10,0 und 15,0 ccm Glycerin versetzt und dann ebenfalls mit Wasser auf 50 aufgefüllt; darauf alle gleichzeitig ins Wasserbad gebracht. Verdauungszeit 15 Stunden. Wasserbad bei 38°.

	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.
25 Eigelb + 10 ccm + 15 H_2O	21,6	33,0	54,6	39,3
„ + 10 ccm + 15 H_2O	22,4	33,7	56,1	40,0
„ + 10 ccm + 15 H_2O	22,0	35,1	58,1	39,7
„ + 10 ccm + 5 Glycerin + 10 Wasser	21,9	34,5	56,4	39,0
„ + 10 ccm + 10 Glycerin + 10 Wasser	22,2	31,7	53,9	41,1
„ + 10 ccm + 15 Glycerin	21,5	33,8	55,3	39,0
„ + 10 ccm gekocht + 15 Wasser	1,9	57,9	59,8	3,0

Diese Versuche zeigen, daß sich einerseits bei Anwendung von sorgfältig hergestellten Aufschwemmungen eine Sedimentierung wohl vermeiden läßt, andererseits, daß ein hemmender Einfluß

des Glycerins auf die Wirkung des Steapsins nicht besteht. Da ich diese Ergebnisse auch späterhin des öfteren bestätigt fand, wählte ich zu mehreren der folgenden Versuchsreihen Aufschwemmungen, die in gleicher oder ähnlicher Weise, wie die hier beschriebenen, hergestellt wurden. In einem andern Teil der Versuche verwandte ich eine Glycerinlösung des Pankreatins, von der Konzentration 6,0 : 250, wobei aber von diesen 6 g nur ein Bruchteil wirklich in Lösung ging.

Nachdem durch die Versuchsreihe II die oben angedeuteten Bedenken beseitigt waren, richteten sich die folgenden Versuchsreihen auf den Einfluß der Fermentmenge auf die Spaltungsgröße.

IV. Versuche über den Einfluß der Fermentmenge auf die Größe der Spaltung.

Da sich schon bei Pawlow[9]) und Walther[10]) eine Notiz findet, daß sich die Mengen der durch Steapsin abgespaltenen Fettsäure verhalten wie die Quadratwurzeln aus den angewandten Saftmengen, so wurde die Versuchsanordnung gleich so gewählt, daß die Pankreatinmengen sich verhielten wie die Quadrate ganzer Zahlen, also wie 1 : 4 : 9 usw.

Versuchsreihe III.

Versuchsanordnung: Von einem Glycerinextrakt aus „absolutem Pankreatin Rhenania“ werden 110 ccm abfiltriert, mit 100 ccm Wasser gemischt. Von der Mischung werden alsdann 1, 4, 9, 16, 25 und 36 ccm in 200 ccm haltende Flaschen gebracht, mit 20 ccm Eigelbemulsion versetzt, mit Wasser auf 60 ccm aufgefüllt und 6 Stunden im Wasserbad belassen. Temperatur des Wasserbades 30°.

Fermentmenge	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f}}$
1 ccm	2,3	46,3	48,6	4,7	**4,7**
4 ccm	5,1	46,0	51,1	10,0	**5,0**
9 ccm	7,50	42,4	49,9	15,0	**5,0**
16 ccm	10,1	41,7	51,8	19,5	**4,9**
25 ccm	11,1	38,7	49,8	22,3	**4,5**
36 ccm	12,3	38,6	50,9	24,1	4,0

Versuchsreihe IV.

Versuchsanordnung: Von einem Glycerinextrakt aus „absolutem Pankreatin“ werden 65 ccm filtriert und auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt; von diesem Gemisch werden 1, 4, 9, 16, 25 und 36 ccm mit je

20 ccm Eigelbemulsion in Fläschchen gebracht, diese sämtlich mit Wasser auf 60 ccm aufgefüllt und 18 Stunden im Wasserbad belassen. Wasserbad bei 40°.

Ferment-menge	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f}}$
1 ccm	7,1	48,4	55,5	12,8	**12,8**
4 ccm	14,5	44,3	58,8	24,7	**12,3**
9 ccm	21,6	33,0	54,6	39,5	**13,2**
16 ccm	28,9	27,1	56,0	51,6	**12,9**
25 ccm	34,6	23,5	58,1	59,5	**11,9**
36 ccm	36,4	21,3	57,7	63,1	10,5

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß in der Tat für die Steapsinwirkung das Gesetz $v_1 : v_2 = \sqrt{f_1} : \sqrt{f_2}$ Geltung hat (v = Spaltungsgröße, f = Fermentmenge), daß die Geltung des Gesetzes aber beschränkt ist, d. h., daß es bei Erreichung größerer Spaltungswerte allmählich seine Geltung verliert.

Die Grenze, bis zu welcher die Gesetzmäßigkeit Geltung hat, ist übrigens nicht konstant, etwa bei einem bestimmten Prozentgehalt des Verdauungsgemisches an abgespaltener Fettsäure gegeben. Sondern das gesetzmäßige Verhalten reicht bedeutend weiter bei dem Versuch IV mit der konzentrierteren Fermentlösung. Hier tritt ein Nachlaß der Gesetzmäßigkeit erst bei 50 bis 60 Proz. Fettspaltung ein, während bei dem Versuch mit der schwächeren Lösung das gesetzmäßige Verhalten nur bis zu 20 Proz. abgespaltener Fettsäure reicht.

Unterhalb dieser Grenze ist aber die Übereinstimmung der erhaltenen Werte mit den nach dem Wurzelgesetz zu erwartenden eine überraschend genaue.

In den bisherigen Versuchsreihen war die Dauer der Fermentwirkung absichtlich gleich gewählt. Die folgenden Versuche beschäftigen sich dagegen mit dem Einfluß verschiedener Verdauungszeiten; daher wurde innerhalb derselben umgekehrt der Faktor f, d. h. die Fermentmenge gleich genommen, damit die Spaltungsgröße rein als Funktion der Verdauungszeiten erscheine.

V. Einfluß der Verdauungszeiten auf die Größe der Spaltung.

Auch hier wurden die Verdauungszeiten als Quadrate ganzer Zahlen gewählt.

Versuchsreihe V.

Je 10 ccm eines Glycerinextrakts aus Pankreatin werden 1, 4, 9, 16 und 25 Stunden mit 20 ccm Eigelbemulsion + 20 H_2O der Digestion im Wasserbad überlassen. Wasserbad bei 41°.

Zeit	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.	$\frac{p}{\sqrt{t}}$
1 Stunde	11,8	30,3	42,1	28,0	**28,0**
4 Stunden	23,7	20,8	44,5	53,3	**26,6**
9 Stunden	27,7	15,1	42,8	64,7	21,6
16 Stunden	33,1	10,1	43,2	76,9	19,2
25 Stunden	34,8	8,5	44,3	79,3	15,8

Versuchsreihe VI.

30 ccm des in der vorigen Versuchsreihe benutzten Glycerinextrakts werden auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt. Von diesem Gemisch werden je 10 ccm in 200 ccm haltenden Fläschchen mit 20 ccm Eigelbemulsion + 20 H_2O 1, 4, 9, 16 und 25 Stunden im Wasserbad belassen. Wasserbad bei 40°.

Zeit	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.	$\frac{p}{\sqrt{t}}$
1 Stunde	6,9	36,9	43,8	15,8	**15,8**
4 Stunden	13,1	31,1	44,2	29,6	**14,8**
9 Stunden	17,3	23,8	41,1	42,1	**14,0**
16 Stunden	24,7	19,5	44,2	55,9	**14,0**
25 Stunden	26,8	14,1	40,9	65,5	13,0

Aus diesen Versuchen geht in der Tat hervor, daß sich die Spaltungsgrößen bei gleichen Fermentmengen ziemlich genau so verhalten, wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Allerdings zeigen die Werte für v bei den Zeitversuchen nicht die scharfe Gesetzmäßigkeit, wie sie bei den Versuchen mit verschiedenen Fermentmengen beobachtet wurde. Es mag dies z. T. damit zu erklären sein, daß in beiden Versuchsreihen sehr wirksame, schnell hohe Werte liefernde Fermentlösungen verwendet worden waren. Speziell bei Versuchsreihe V kann das Nachlassen des Zeitgesetzes nicht Wunder nehmen, da schon nach 4 Stunden über 50 Proz. zerlegt waren. Andrerseits finden wir doch noch bei Versuchsreihe VI ein so gleichmäßiges, wenn auch geringes Absinken der Wirkung unter die nach dem Gesetz zu erwartende, daß wir hier wohl eine mit der Verdauungszeit zunehmende Abschwächung, vielleicht ein langsames Zugrundegehen des empfindlichen Fermentes annehmen müssen.

VI. Einfluß von Verdauungszeit und Fermentmenge auf die Größe der Fettspaltung.

In den folgenden Versuchsreihen wurden die beiden bisherigen Versuchsanordnungen kombiniert und sowohl die Verdauungszeiten als die Fermentmenge variiert.

Wenn das Gesetz $v : v_1 = \sqrt{f.t} : \sqrt{f_1 . t_1}$ richtig ist, so muß bei Variierung von f und t für dieselbe Fermentlösung der Quotient $\frac{v}{\sqrt{f.t}}$ konstant sein.

Die folgenden Versuchsreihen bestätigen dies mit einer besonders in Versuch VIII ganz frappanten Genauigkeit, wenn man die Fehlerquellen der Methode berücksichtigt, welche durch zwei Titrationen und zweimaliges Abmessen von Normallösungen bedingt sind.

Versuchsreihe VII.

Versuchsanordnung: Es wurden je 3 mal 0,04, 0,09 und 0,16 g trockenes Pankreatin auf der Wage abgewogen und in 9 Fläschchen gebracht zusammen mit je 25 ccm einer Eigelbemulsion (9 : 300). Je 1 Fläschchen mit 0,04, 0,09 und 0,16 g wurde alsdann 4, bzw. 9, bzw. 25 Stunden (das letztere infolge eines Versehens, es waren 16 Stunden beabsichtigt) ins Wasserbad gebracht und darauf in der beschriebenen Weise verfahren. Wasserbad bei 41°.

	4 Stunden					9 Stunden					25 Stunden				
	1. Titration	2. Titration	I + II	v i. Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$	I	II	I + II	v i. Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$	I	II	I + II	v i. Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
0,04 g	4,6	21,5	26,1	17,6	**4,4**	6,5	28,9	35,4	18,4	**3,1**	6.6	12,3	18,9	35,0	**3,5**
0,09 g	6,4	24,1	30,6	20,9	**3,5**	12,9	22,6	35,5	36,3	**4,0**	17,8	12,8	30,6	58,2	**3,8**
0,16 g	11,3	20,8	32,1	35,2	**4,4**	9,1	9,7	18,8	48,4	**4,0**	23,3	9,0	32,3	72,1	**3.6**
0 g	1,2	45,0	46,2	2,5											
0 g											1,3	45,8	47,1	2,9	

Der mittlere Wert von $\frac{v}{\sqrt{f.t}} = 3,8$.

Versuchsreihe VIII.

2,0 g Pankreatin werden mit 200,0 ccm Wasser geschüttelt und nach ¼stündigem Absetzenlassen rasch je 3 mal 1, 4 und 9 ccm abpipettiert und in 200-Grammfläschchen gegeben, alle auf 10 ccm aufgefüllt und mit je 20 ccm einer Eigelbemulsion (3 Eidotter Wasser ad 100,0) beschickt;

alsdann werden je 3 Fläschchen mit 1 bzw. 4 bzw. 9 ccm Aufschwemmung A. 4, B. 9, C. 16 Stunden der Digestion im Wasserbad unterworfen. Wasserbad bei 40°.

A. Zeit 4 Stunden.

Fermentmenge	1. Titration	2. Titration	Summe	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f}}$	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
1 ccm	2,2	48,1	50,3	4,4	4,4	**2,2**
4 ccm	4,2	45,2	49,3	8,5	4,25	**2,13**
9 ccm	7,1	37,4	44,5	15,9	5,3	**2,65**
B. Zeit 9 Stunden.						
1 ccm	3,4	45,5	48,8	7,0	7,0	**2,3**
4 ccm	5,7	40,5	46,2	12,3	6,15	**2,05**
9 ccm	10.8	40,2	51,0	21,6	7,2	**2,4**
C. Zeit 16 Stunden.						
1 ccm	4,3	45,6	49,9	8,6	8,6	**2,15**
4 ccm	8,1	38,8	46.9	17,3	8,6	**2,15**
9 ccm	14,1	33,8	47,9	29,4	9,8	**2,45**

Der mittlere Wert von $\frac{v}{\sqrt{f.t}}$ beträgt 2,27.

Wenn in Versuchsreihe VII die Übereinstimmung eine weniger scharfe ist, so läßt sich das ungezwungen daraus erklären, daß das Ferment in ungelöstem Zustande verwandt worden ist.

VII. Analoge Versuche mit Magensaft.

Zum Schlusse füge ich noch eine Versuchsreihe an, welche ich vor den Steapsinversuchen mit Magensaft angestellt habe, um mich auf die Volhardsche Methode einzuüben. Sie liefert auch zugleich einen Beweis für die Genauigkeit der Methode, die aus der guten Übereinstimmung der durchgehends doppelt angestellten Versuche erhellt.

Versuchsreihe IX.

Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle ersichtlich. Es wurde neutralisierter Magensaft verwendet, und jeder Versuch doppelt angesetzt.

Zeit	Saftmenge	I	II	Summe	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
1 Stunde	1 ccm	1,24 1,14	20,47 21,9	21,71 23,07	5,7 5,1	**5,4**
	4 ccm	2,62 2,51	21,24 20,46	23,86 22,97	11,0 10,9	**5,47**
	9 ccm	3,84 3,91	19,4 18,51	23,24 22,42	16,6 17,5	**5,68**

Zeit	Saftmenge	I	II	Summe	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
3 Stunden	1 ccm	2,4 2,32	20,94 20,8	23,34 23,21	10,3 10,0	5,86
	4 ccm	4,86 4,84	18,97 18,86	23,83 23,7	20,4 20,4	5,89
	9 ccm	6,70 6,50	17,45 17,01	24,15 23,51	27,7 27,6	5,33
9 Stunden	1 ccm	3,96 4,0	18,85 18,7	22,81 22,7	17,4 17,6	5,83
	4 ccm	7,29 7,37	15,71 15,68	23,0 23,05	31,7 32,0	5,31
	9 ccm	9,1 9,04	14,75 —	23,85 —	34,3 —	3,8

Der Mittelwert für $\frac{v}{\sqrt{f.t}}$ beträgt in den 8 Versuchen, die unter das Gesetz fallen, 5,46.

Bei einem Parallelversuche mit demselben aber nicht neutralisierten Magensafte ergab sich ein starkes Abweichen von der Regel, wohl bedingt durch den bekannten schädlichen Einfluß der Salzsäure. Ich führe nur die Prozente abgespaltener Fettsäure und die Mittelwerte für $\frac{v}{\sqrt{f.t}}$ an.

Versuchsreihe X.

Versuchsanordnung: Wie bei Versuch IX, mit dem dieser Versuch gleichzeitig angestellt wurde. Der Magensaft war aber nicht neutralisiert.

	1 Stunde		3 Stunden		9 Stunden	
	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$	Proz.	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
1 ccm	7,7 7,8	7,75	13,3 12,9	7,57	17,3 17,7	5,8
4 ccm	15,2 14,7	7,48	25,1 24,8	7,21	33,9 34,9	5,75
9 ccm	18,2 17,3	5,92	26,1 28,1	5,3	34,6 34,7	3,85

Durch die Anwendung der Formel $k = \frac{v}{\sqrt{f.t}}$ erhalten wir für die betreffende Fermentlösung eine Konstante, welche uns angibt, wieviel Prozent Fettsäure 1 ccm der Lösung in einer Stunde abzuspalten vermag. Diese Konstante unterliegt aber als Verdauungsprodukt natürlich noch dem Wurzelgesetz, denn eine Fermentlösung, von der 1 ccm in 1 Stunde 12 Proz. abspaltet, muß

4 mal mehr Ferment enthalten, als die, von welcher 1 ccm in 1 Stde. 6 Proz. abspaltet.

Um also die Fermentkonzentration x zahlenmäßig auszudrücken, müssen wir die Konstante k aufs Quadrat erheben.

Denn k ist ja nur ein Faktor von f, der Faktor, den wir durch den Versuch ermitteln, während f die Anzahl der im Versuch angewandten ccm Fermentlösung bedeutet. Nach Volhard bezeichnen wir als Fermenteinheit diejenige Fermentmenge, welche in einer Stunde 1 Proz. Fettsäure abspaltet. Verstehen wir unter x die Anzahl Fermenteinheiten in 1 ccm Saft, so lautet die Formel $\frac{v}{\sqrt{x . f . t}} = 1$, $\sqrt{x} = \frac{v}{\sqrt{f . t}}$ oder $x = \frac{v^2}{f . t}$. Zum Beispiel: Ein Saft, von welchem 2,5 ccm in 10 Stunden 35 Proz. Fettsäure abspalten, enthält 49 Fermenteinheiten pro ccm, seine Konstante ist 7, in 1 Stunde würde 1 ccm $\frac{35}{\sqrt{25}} = 7$ Proz. Fettsäure frei machen, demnach ist er 49mal fermentreicher als ein Saft, von welchem 1 ccm in 1 Stunde 1 Proz. abspalten würde.

Literaturverzeichnis.

1) E. Schütz, Zeitschrift für physiol. Chemie **9**, 577 (1885).

2) Borissow und Linossier, Journal de physiologie et de pathologie générale **1**, Nr. 2 (1899).

3) Huppert und Schütz, Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie **80**, 1900.

4) Volhard, Zeitschr. f. klin. Medizin **42**, Heft 5 u. 6 (1901).

5) Volhard, das. **43**, Heft 5 u. 6.

6) Volhard, Verhandlungen der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte 1901, **73**, Hamburg.

7) Stade, Diese Beiträge **3**, Heft 7 u. 8.

8) Volhard, Über eine neue Methode zur quantitativen Pepsinbestimmung usw. Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49.

9) Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, übersetzt von Walther. Wiesbaden 1898.

10) Walther, Archives des sciences biologiques publiées par l'Institut Impérial de medicine experimentale à St. Petersburg **7**.

VII.

Untersuchungen über das Zeitgesetz des menschlichen Labfermentes und dessen quantitative Bestimmung.

Von Dr. med. **Georg Becker**,
z. Z. Assistent am pathologischen Institut Gießen.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Gießen. Stellvertr. Direktor: Privatdozent Dr. Volhard.)

Seit Hammarstens grundlegenden Arbeiten hat das Labferment in hohem Grade das Interesse der Forscher erregt. Trotz der zahlreichen Arbeiten, von deren Reichhaltigkeit Fulds Übersicht in Asher-Spiros Ergebnissen der Physiologie[1]) einen Begriff gibt, ist die praktische Verwertung des Labfermentes für die Prognose und Diagnose der Magenkrankheiten noch sehr gering. Die in dieser Richtung gemachten Versuche (Gläßner) halten der Kritik nicht stand. Der Hauptgrund hierfür liegt in dem Mangel einer exakten quantitativen Bestimmung des Labfermentes. Das Kälberlab, dessen milchwirtschaftliches Interesse zu einer Fülle wissenschaftlicher Untersuchungen geführt hat, zeigt ein gesetzmäßiges Verhalten zwischen Gerinnungszeit und Labmenge derart, daß das Produkt aus Labmenge und Gerinnungszeit konstant ist: $L \times t = C$; die Gerinnungszeiten t sind also umgekehrt proportional den Labmengen L.

Dieses Zeitgesetz der Labung, das für mittlere Zeiten schon mehrfach durch frühere Untersuchungen (Hansen, Soxhlet) als richtig erwiesen war, hat neuerdings Fuld[2]) auch für ganz kurze und sehr lange Gerinnungszeiten und beliebige Labmengen bestätigt.

Daß dieses Zeitgesetz nicht ohne weiteres auf das menschliche Labferment übertragen werden könne, ist schon von verschiedenen Autoren betont. Insbesondere hat schon Bang[3]), der zuerst die Verschiedenheit des menschlichen Labfermentes von dem Kälberlab nachwies und es im Gegensatz zu diesem, dem Chymosin, als Parachymosin bezeichnete, auf den bei beiden Fermenten verschiedenen Verlauf der Verdünnungskurven hinge-

wiesen. Die Erklärung für diesen Unterschied zeigt keine Übereinstimmung. Während Pawlow und Parastschuk[4]) z. B. in ihrer eben erschienenen Arbeit den Grund suchen in den zu länger dauernden Versuchen nötigen Verdünnungen, wodurch neben der Fermentmenge gleichzeitig die gerinnungsfördernde Säure des Magensaftes vermindert wird, führt Fuld die Abweichung des Parachymosins von dem Zeitgesetz hauptsächlich auf die bisherige Versuchsanordnung zurück, bei welcher die Labung bei Brutwärme vorgenommen und so das Ferment durch längere Einwirkung der Bruttemperatur zerstört wurde. Fuld[5]) hat jüngst die Hoffnung erweckt, durch eine bestimmte Versuchsanordnung, eine Modifikation des Morgenrothschen[6]) Verfahrens, das Zeitgesetz auch für das Parachymosin als richtig zu erweisen. Er fand, „daß durch Überführung des Kaseins in Parakasein bei niederer Temperatur und nachfolgender 5 Minuten langer Erwärmung im Wasserbad von 40° C eine durchaus befriedigende Methode zur Bestimmung der eben zur Verkäsung eines bestimmten Milchvolumens bei bestimmter Temperatur und bestimmter Wirkungszeit genügenden Labmenge gegeben ist".

Herr Privatdozent Dr. Volhard veranlaßte mich, Versuche darüber anzustellen, ob man durch die Fuld-Morgenrothsche Versuchsanordnung die Giltigkeit des Zeitgesetzes auch für das Parachymosin nachweisen könne.

Versuchsanordnung.

Als Fermentlösung verwendeten wir Magensaft, der eine Stunde nach dem Probefrühstück ausgehebert wurde; zur Kontrolle stellten wir gleichzeitig Versuche mit Kälberlab in Form der Labessenz, wie sie in der hiesigen Molkerei gebraucht wird, an.

Es wurden in gekühlten Gläsern verschiedene Verdünnungen der labhaltigen Flüssigkeit (Labessenz und Magensaft) hergestellt, derart, daß die folgende immer die $^1/_{10}$ fache Konzentration der vorhergehenden hatte: Verdünnung I also aus 1 ccm des unverdünnten Saftes und 9 ccm Wasser, Verdünnung II aus 1 ccm von I und 9 ccm Wasser bestand, sodaß folgende Verdünnungen gewonnen wurden:

Verdünnung I = $^1/_{10}$, Verdünnung II = $^1/_{100}$. Verdünnung III = $^1/_{1000}$, Verdünnung IV = $^1/_{10000}$, Verdünnung V = $^1/_{100000}$.

Um den weiteren Gang des Versuches an einem praktischen Beispiel durchzuführen, teile ich den mit Kälberlab angestellten Kontrollversuch mit. Es wurde in 4 Gläser von den Verdünnungen I bis IV je 1 ccm zu 10 ccm Milch gebracht, die nach der Empfehlung Fulds durch Senfölzusatz vor bakterieller Säuerung geschützt war. Diese 4 Gläser wurden

$^1/_2$ Stunde in den Eisschrank gestellt und dann für 5 Minuten in ein konstantes Warmbad von 40° C gebracht. Es zeigte sich Gerinnung in den Gläsern, die mit den Verdünnungen I und II versetzt waren, nicht in den mit III und IV versetzten Gläsern. Es genügte also, um in $^1/_2$ Stunde die Gerinnung der 10 ccm Milch hervorzurufen, der Zusatz von 1 ccm einer auf $^1/_{100}$ verdünnten Labessenz, es genügte nicht mehr 1 ccm $^1/_{1000}$ Labessenz. Um den Grenzwert der Gerinnung für $^1/_2$ Stunde genauer zu bestimmen, wurden in 9 Gläser je $^9/_{10}$, $^8/_{10}$ usw. absteigend bis $^1/_{10}$ ccm von der Verdünnung II $= ^1/_{100}$ gefüllt und zu jedem 10 ccm Milch zugegeben. Für 5 Stunden, also die 10fache Zeit, wurde derselbe Versuch angestellt, nur daß von der 10fachen Verdünnung, also von III $= ^1/_{1000}$ $^9/_{10}$ bis $^1/_{10}$ ccm zugesetzt wurden. Ebenso wurde für 20 Stunden ein entsprechender Versuch angestellt.

In den folgenden Tabellen ist die Gerinnungsgrenze durch einen wagerechten Doppelstrich angezeigt.

Tabelle I.

Labessenzversuch.

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	II $= ^1/_{100}$	III $= ^1/_{1000}$	IV $= ^1/_{10000}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1

Nach dem Zeitgesetz hätte man, wenn bei dem $^1/_2$-Stundenversuch die Grenze zwischen $^2/_{10}$ und $^1/_{10}$ der Verdünnung II $= ^1/_{100}$ lag, bei dem 5-Stundenversuch ebenso die Grenze zwischen $^2/_{10}$ und $^1/_{10}$ der Verdünnung III $= ^1/_{1000}$ erwarten sollen, doch blieb bei zahlreichen Wiederholungen des Versuchs das Resultat dasselbe. Das Produkt aus Labmenge und Gerinnung ergibt für

$^1/_2$ Stde.: $^2/_{10} \cdot ^1/_{100} \cdot 0{,}5 = 0{,}001$
5 Stdn.: $^3/_{10} \cdot ^1/_{1000} \cdot 5 = 0{,}0015$
20 Stdn.: $^5/_{10} \cdot ^1/_{10000} \cdot 20 = 0{,}001$

Derselbe Versuch mit dem Parachymosin, dem milchkoagulierenden Ferment des menschlichen Magensaftes, konnte uns das Zeitgesetz nicht bestätigen. Die Versuchsergebnisse waren folgende:

Tabelle II.

Magensaft Brückel (Freie HCl 58, Gesamtacidität 63 Alizarin, 72 Phenolphthalein).

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5
Konzentration der Verdünnung	I = $^1/_{10}$	II = $^1/_{100}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1
Produkt von Labmenge × Zeit	0,01	0,02

Tabelle III.

Magensaft Appel (Freie HCl 42, Gesamtac. 48 Aliz., 54 Phenolphth.)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	I = $^1/_{10}$	I und II = $^1/_{100}$	I und II
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Saftes in ccm		2^{-2}	2^{-2}
		1^{-2}	1^{-2}
	9^{-2}	9^{-3}	9^{-3}
	8^{-2}	8^{-3}	8^{-3}
	7^{-2}	7^{-3}	7^{-3}
	6^{-2}	6^{-3}	6^{-3}
	5^{-2}	5^{-3}	5^{-3}
	4^{-2}	4^{-3}	4^{-3}
	3^{-2}	3^{-3}	3^{-3}
	2^{-2}	2^{-3}	2^{-3}
	1^{-2}	1^{-3}	1^{-3}
Produkt von Labmenge × Zeit	0,015	0,05	0,2

Tabelle IV.

Magensaft Korak (Freie HCl 42, Gesamtac. 49 Aliz., 60 Phenolphth.)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5
Konzentration der Verdünnung	0 = nativer Saft	I = $^1/_{10}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1
Produkt von Labmenge × Zeit	0,1	0,3

Tabelle V.

Magensaft Schütz (Freie HCl 24, Gesamtac. 47 Aliz., 57 Phenolphth.)

Dauer des Versuchs in Stunden	1	20
Konzentration der Verdünnung	I = $^1/_{10}$	II = $^1/_{100}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1
Produkt von Labmenge × Zeit	0,07	0,12

Tabelle VI.

Magensaft N (Freie HCl 25, Gesamtac. 30 Aliz., 40 Phenolphth.)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	I = $^1/_{10}$	I und II = $^1/_{100}$	II = $^1/_{100}$
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Saftes in ccm		1^{-2}	
	9^{-2}	9^{-3}	9^{-3}
	8^{-2}	8^{-3}	8^{-3}
	7^{-2}	7^{-3}	7^{-3}
	6^{-2}	6^{-3}	6^{-3}
	5^{-2}	5^{-3}	5^{-3}
	4^{-2}	4^{-3}	4^{-3}
	3^{-2}	3^{-3}	3^{-3}
	2^{-2}	2^{-3}	2^{-3}
	1^{-2}	1^{-3}	1^{-3}
Produkt von Labmenge × Zeit	0,035	0,05	0,14

Tabelle VII.

Magensaft Rühl (Freie HCl 24, Gesamtac. 30 Aliz., 40 Phenolphth.)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	0 = nativer Saft	I = $^1/_{10}$	I = $^1/_{10}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1
Produkt von Labmenge × Zeit	0,1	0,3	0,4

In keinem der untersuchten Fälle fanden wir das Zeitgesetz bestätigt. Am nächsten kam ihm noch der Fall Brückel (Tabelle II). Mit Abnahme der Konzentration der Fermentlösung (des Magensaftes) trat eine dieser nicht proportionale Verzögerung und schließliche Sistierung der Gerinnung ein, das Ferment wurde in seiner Wirkung gehindert und schließlich unwirksam. Das Produkt $L \times t$ ist also nicht konstant, sondern wird mit zunehmender Zeit immer größer, und bei einer gewissen Verdünnung tritt auch bei noch so langer Zeit keine Gerinnung mehr ein.

Vergleicht man die verschiedenen Saftmengen, die in den verschiedenen Versuchen nötig waren, um eine Gerinnung hervorzurufen, so scheinen sie gar kein gesetzmäßiges Verhalten zwischen Menge und Zeit zu ergeben.

Tabelle VIII.
Grenzwerte der Gerinnung bei verschiedenen Magensäften.

Magensaft	Minimalster Zusatz, der Gerinnung hervorruft in		
	$^1/_2$ Stde.	5 Stdn.	20 Stdn.
Brückel	2^{-2}	4^{-3}	—
Korak	2^{-1}	6^{-2}	—
Appel	3^{-2}	1^{-2}	1^{-2}
N	7^{-2}	1^{-2}	7^{-3}
Rühl	2^{-1}	6^{-2}	2^{-2}

Daß die milchkoagulierende Kraft der einzelnen Säfte verschieden von einander sei, war ja von vornherein anzunehmen; auffallend ist aber, daß der Magensaft von Rühl, der für $^1/_2$ Stunde fast der zehnfachen Konzentration (0,2) bedarf als der von Appel (0,03), in 20 Stunden fast in derselben Konzentration (0,02) wirkt wie dieser (0,01). Daß sowohl bei Rühl wie bei N., die nebenbei bemerkt genau dieselben Salzsäurewerte haben, bei dem $^1/_2$-Stundenversuch sich als Grenzwert der Gerinnung die 10fache Konzentration ergab gegenüber dem 20-Stundenversuch, dürfte wohl zufällig sein, zumal der 5-Stundenversuch bei beiden ganz verschieden ausfiel. Ebenso ist die Übereinstimmung bei Korak und Rühl wohl Zufall.

In ihrer anfangs erwähnten Arbeit, in der sie die Identität des proteolytischen und Labfermentes nachzuweisen suchen, haben Pawlow und Parastschuk darauf aufmerksam gemacht, daß wir durch Zusatz verschiedener Mengen einer sauren Lösung des

Fermentes, wie sie der normale Magensaft darstellt, in der Milch den Gehalt sowohl an Ferment als auch an Säure in ein und demselben Verhältnis ändern, d. h. wenn wir z. B. die Menge des Fermentes um das Doppelte vermehren, so wächst zugleich auch die Menge der Säure auf das Doppelte an. Sie leiten daher für den sauren Magensaft die Regel ab, daß die Mengen des Fermentes sich umgekehrt proportional wie die Quadratwurzeln der Gerinnungszeiten verhalten. Wenn wir daraufhin unsere Resultate ansehen, so finden wir allerdings in 4 Fällen eine ungefähre Bestätigung wenigstens für den ½- und 5-Stundenversuch.

Tabelle IX.

Magensaft	Verhältnis der Fermentmengen	Umgekehrtes Verhältnis der Quadratwurzeln der Gerinnungszeit.
Rühl	0,2 : 0,06	$\sqrt{5} : \sqrt{1/2} = 3{,}16$
Appel	0,03 : 0,01	
Brückel	0,04 : 0,01	
Korak	0,2 : 0,06	

Die beiden übrigen Magensaftversuche gaben dagegen ein von dieser Regel ganz abweichendes Resultat.

Tabelle X.

Magensaft	Verhältnis der Fermentmengen	Umgekehrtes Verhältnis der Quadratwurzeln der Gerinnungszeit.
N	0,07 : 0,01	$\sqrt{5} : \sqrt{1/2} = 3{,}16$
Schütz	0,007 : 0,0006	$\sqrt{20} : \sqrt{1} = 4{,}47$

Da den vier bestätigenden Versuchen zwei nicht passende gegenüber stehen, können wir die Regel nicht verallgemeinern, zumal auch in den der Regel folgenden Versuchen eine Ausdehnung derselben auf 20 Stunden nicht möglich ist.

Das Bestreben, die zeitliche Gesetzmäßigkeit der Labwirkung unabhängig von der in verschiedenen Konzentrationen verschiedenen Säuremenge zu studieren, legte den Gedanken nahe, in dieser Beziehung für alle Konzentrationen gleiche Bedingungen zu schaffen durch Verwendung von gekochtem Saft als Verdünnungsflüssigkeit statt Wasser. Gleichzeitig wurden die zugefügten fermenthaltigen Saftmengen je zu 1 ccm mit gekochtem Saft ergänzt, eine in ähn-

licher Weise schon von Fuld verwandte Versuchsanordnung. So erhielt man Zusätze zur Milch, die verschiedene Fermentmengen, aber gleiche Säuremengen enthielten. Sollte wirklich die Verschiedenheit der zeitlichen Verhältnisse bei dem Chymosin und Parachymosin auf der gleichzeitigen Säurewirkung bei diesem beruhen, wie Pawlow-Parastschuk vermuten, so müßte bei dieser Versuchsanordnung, wo die Säuremengen gleich sind, das Zeitgesetz ($L \times t = C$) sich bestätigen. Dies ist aber nicht der Fall.

Tabelle XI.

Magensaft Brückel (Verdünnung und Auffüllung mit gekochtem Saft)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5
Konzentration der Verdünnung	$I = {}^1/_{10}$	$II = {}^1/_{100}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Vergleicht man die Resultate dieses Versuches mit den in Tabelle II mitgeteilten desselben Saftes ohne Verwendung gekochten Saftes, so findet man sie für den $^1/_2$-Stundenversuch gleich, beim 5-Stundenversuch tritt sogar die Gerinnung bei einer höheren Konzentration ein, wenn man gekochten Saft statt Wasser als Verdünnungsflüssigkeit benutzt. Wenn dies auch zufällig sein mag, so ist auf alle Fälle durch diese Versuchsanordnung das Zeitgesetz nicht als richtig zu erweisen, wie auch folgender Versuch bestätigt. (Siehe Tabelle XII auf Seite 98.)

Ein mit Verdünnungen dieses Mischsaftes von 0,001 ccm (= II_1) an abwärts angestellter Versuch zeigte nach 20 Stunden überhaupt keine Gerinnung. Diese Versuche bestätigen die von Lörcher[7]) gemachte Beobachtung, daß eine solche geringe Säuremenge, wie sie im Magensaft enthalten ist, nur eine unbedeutende, ernstlich nicht in Betracht kommende Eigenwirkung entfaltet.

Tabelle XII.

Mischsaft (Säurewerte: 27, 41, 55). Verdünnung und Auffüllung mit gekochtem Saft.

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5
Konzentration der Verdünnung	I = 1/10	II = 1/100
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in 1/10 ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Da an die Möglichkeit zu denken war, daß die relativ verminderte milchgerinnende Kraft des Magensaftes bei längerer Dauer in einer Schädigung des Parachymosins durch die Verdünnungsflüssigkeit zu suchen sei, zumal wir statt der von Fuld angegebenen 1/10-Normalkochsalzlösung Leitungswasser verwandt hatten, stellten wir einen Versuch mit Magensaftverdünnungen an, die 24 Stunden gestanden hatten. Die Resultate der hiermit angestellten 5- und 20-Stundenversuche deckten sich mit den früher gefundenen und ließen uns die Verdünnung an sich als Grund der Abweichung von dem Zeitgesetz ausschließen.

Noch einen anderen Versuch stellten wir an, um die Einwirkung der Verdünnungsflüssigkeit (Wasser) auf die Fermentwirkung zu prüfen. Wir verwendeten als milchkoagulierendes Agens

A nativen Saft,

B 5 ccm nativen Saft verdünnt mit 5 ccm Wasser,

C 5 ccm von B verdünnt mit 5 ccm Wasser

und stellten damit 1/2-Stundenversuche an. (Siehe Tabelle XIII auf Seite 99.)

Die Gerinnung trat in den drei Fällen an den der Fermentmenge entsprechenden Stellen ein, unbeeinflußt von der verschiedenen Menge der Verdünnungsflüssigkeit.

Tabelle XIII.

Magensaft Korak.

Stammlösung	A	B	C
Menge des zugesetzten Wassers	0	5	7,5
Relative Konzentration des Ferments	4	2	1
Zusätze zu 10 ccm Milch von den Stammlösungen A, B u. C in $^{1}/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1
Konzentrationsverhältnis × Menge	6	5	5,5

Auch hier war also keine merkbare Schädigung des Fermentes durch die Verdünnungsflüssigkeit zu beobachten.

Schon lange ist die gerinnungsbefördernde Wirkung des Chlorcalciums und der Säuren bekannt. Insbesondere hat Pfleiderer[8]) die Säuren auf ihre die Labwirkung unterstützende Kraft untersucht. Bei der Möglichkeit, daß die Hemmung der Gerinnung bei längerer Dauer in chemischen Einflüssen beruhe, durch die das Ferment an seiner Wirkung gehindert werde, und daß die Gerinnungsförderung durch $CaCl_2$ und Säuren die Folge einer Beseitigung solcher chemischen Hemmungen sei, vermuteten wir, daß vielleicht durch Zusatz von Chlorcalcium zur Milch eine Bestätigung des Zeitgesetzes auch für das Parachymosin zu erhalten sei.

Zum Vergleich wurde gleichzeitig der Einfluß des Chlorcalciums auf das Zeitgesetz des Kälberlabs geprüft. Es wurde zu je 9 ccm Milch 1 ccm einer 20 proz. Chlorcalciumlösung gesetzt.

Tabelle XIV.

Kälberlabversuch mit $CaCl_2$-Milch.

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5
Konzentration der Verdünnung	III = 1/1000	IV = 1/10 000
Menge der zu 10 ccm $CaCl_2$-Milch zugesetzten Verdünnung in 1/10 ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Tabelle XV.

Versuch mit Magensaft Rühl und $CaCl_2$-Milch.

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5
Konzentration der Verdünnung	I = 1/10	II = 1/100
Menge der zu 10 ccm $CaCl_2$-Milch zugesetzten Verdünnung in 1/10 ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Der Chlorcalciumszusatz hat also für den ½- und 5-Stundenversuch mit Parachymosin neben einer bedeutenden Förderung der Koagulation (fast um das 10fache) eine geringe Beeinflussung

zugunsten des Zeitgesetzes ergeben; bei dem Kälberlab blieb das Gesetz ziemlich genau bestehen.

In der Erwägung, daß die Chlorcalciumwirkung auf Ansäuerung der Milch beruhen könne (durch Umwandlung der Phosphate), stellten wir auch Versuche an mit Zusatz von Salzsäure zur Milch.

Zuvor untersuchten wir, wieviel $^1/_{10}$-Normal-HCl nötig ist, um in 10 ccm Milch eine Säurefällung hervorzurufen. Wir fanden, daß bei Zusatz von 2,2 ccm $^1/_{10}$-Normal-HCl zu 10 ccm Milch eine ganz leichte flockige Fällung, bei 4 ccm eine deutliche, ausgesprochene Fällung auftrat. Wir wählten deshalb zu den folgenden Versuchen einen Zusatz von 2 ccm Normal-HCl zu 100 Milch. Zunächst prüften wir noch den Einfluß eines solchen Zusatzes auf die Milch bei längerer Dauer ohne Labzusatz. Nach 5 stündigem Stehen im Eisschrank war diese Salzsäuremilch flüssig, dann 5 Minuten ins Warmbad gebracht, blieb sie auch hier flüssig; einige Tropfen Labessenz, jetzt zugesetzt, riefen sofortige Gerinnung hervor. Anders verhielt sich die mit Salzsäure versetzte Milch nach 20 Stunden Aufenthalt im Eisschrank. Zwar kam sie auch hier flüssig aus dem Eisschrank, blieb flüssig nach 5 Minuten Warmbad, nach Zusatz eines Tropfens Labessenz gerann sie aber in einem Falle nicht, in einem zweiten gerann sie unter Bildung eines geringen Gerinnsels. Dieselbe Milch, die nach Warmbad und Labzusatz nicht geronnen war, gab beim Kochen eine feinflockige Fällung. Hiernach ließ sich schon voraussehen, daß zu 20-Stundenversuchen diese mit 2 HCl auf 100 versetzte Milch nicht geeignet sein würde.

Tabelle XVI.

Kälberlabversuch mit HCl-Milch (2 : 100)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	III = $^1/_{1000}$	IV = $^1/_{10000}$	IV = $^1/_{10000}$
Menge der zu 10 ccm HCl-Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1

Tabelle XVII.

Versuch mit Magensaft Rühl und HCl-Milch (2 : 100)

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5
Konzentration der Verdünnung	I = 1/10	II = 1/100
Menge der zu 10 ccm HCl-Milch zugesetzten Verdünnung in 1/10 ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Tabelle XVIII.

Versuch mit Magensaft N und HCl-Milch (2:100)

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5	20
Konzentration der Verdünnung	II = 1/100	III = 1/1000	III = 1/1000
Menge der zu 10 ccm HCl-Milch zugesetzten Verdünnung in 1/10 ccm	9	9	5
	8	8	4
	7	7	3
	6	6	2
	5	5	1
	4	4	9−1
	3	3	8−1
	2	2	7−1
	1	1	6−1

Die Versuche zeigten, daß das Zeitgesetz für Kälberlab durch Zusatz von 2 Normal-HCl zu 100 Milch nicht wesentlich alteriert wird, daß für den Magensaft eine erhebliche Annäherung an das Zeitgesetz stattfindet für den 1/2- und 5-Stundenversuch, während

bei 20 stündiger Einwirkung keine Zunahme der Gerinnung über das bei dem 5-Stundenversuch erreichte Resultat mehr stattfand.

Um zu sehen, ob durch Steigerung des Salzsäurezusatzes die Annäherung noch weiter zu treiben sei, setzten wir Versuche an mit 3 Normal-HCl auf 100 Milch; weiterzugehen verbot die oben mitgeteilte Erfahrung, daß 4 ccm $^{1}/_{10}$ HCl in 10 Milch eine ausgesprochene Säurefällung hervorrief. Die ganz leichte flockige Fällung, die schon bei 2,2 ccm $^{1}/_{10}$-Normal-HCl zu 10 Milch auftrat, glaubten wir vorerst vernachlässigen zu können. Schon der Kälberlabversuch mit Salzsäuremilch 3:100 zeigte eine starke Abweichung von dem Zeitgesetz.

Tabelle XIX.

Kälberlabversuch mit HCl-Milch (3:100)

Dauer des Versuchs in Stunden	$^{1}/_{2}$	5
Konzentration der Verdünnung	IV = $^{1}/_{10000}$	IV u. V = $^{1}/_{100000}$
Menge der zu 10 ccm HCl-Milch zugesetzten Labessenz in ccm		3^{-4}
		2^{-4}
		1^{-4}
	9^{-4}	9^{-5}
	8^{-4}	8^{-5}
	7^{-4}	7^{-5}
	6^{-4}	6^{-5}
	5^{-4}	5^{-5}
	4^{-4}	4^{-5}
	3^{-4}	3^{-5}
	2^{-4}	2^{-5}

Die Wirkung des Magensaftes N auf mit 3 Normal-HCl zu 100 versetzter Milch war folgende. (Siehe Tabelle XX auf Seite 104.)

Es zeigte sich also kein Fortschritt der Gerinnung bei dem 5- gegenüber dem $^{1}/_{2}$-Stundenversuch; die mit 0,3 von der Verdünnung II (= 0,003) versetzte Milch, die schon bei dem $^{1}/_{2}$-Stundenversuch geronnen war, zeigte sich bei dem 5-Stundenversuch ganz verändert: sie bildete eine grünlich-gelbe Flüssigkeit, in der der Rest des Käses schwamm. Sie bot ein Aussehen, als ob sie verdaut

worden sei. Die übrigen Verdünnungen hatten keine Gerinnung gegeben.

Tabelle XX.

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5
Konzentration der Verdünnung	II = $^1/_{100}$	II und III = $^1/_{1000}$
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Magensaftes N in ccm		3^{-3}
		2^{-3}
		1^{-3}
	9^{-3}	9^{-4}
	8^{-3}	8^{-4}
	7^{-3}	7^{-4}
	6^{-3}	6^{-4}
	5^{-3}	5^{-4}
	4^{-3}	4^{-4}
	3^{-3}	3^{-4}
	2^{-3}	2^{-4}

Bei der Möglichkeit, daß die Veränderungen des Käses auf Pepsinwirkung beruhten, suchten wir eine solche auszuschließen durch Zusatz von Kochsalz, das bekanntlich eine die Pepsinverdauung hemmende Wirkung hat. Allerdings war von vornherein die die Labwirkung hemmende Wirkung des Kochsalzes als störend zu erwarten [Lörcher[7])].

Es wurden 90 ccm Milch mit 2 ccm Normal-HCl und 10 ccm konzentrierter NaCl-Lösung gemischt und davon je 10 ccm mit folgenden Verdünnungen des Magensaftes N versetzt. (Siehe Tabelle XXI auf Seite 105.)

In beiden Fällen war keine Gerinnung eingetreten; die Milch erschien ganz durchsichtig und gerann nicht mehr nach Labzusatz mit Erwärmen.

Als drittes Ansäuerungs- und so gerinnungsförderndes Mittel verwendeten wir noch das primäre Kaliumphosphat, um seinen Einfluß auf das Zeitgesetz zu studieren. Die Phosphorsäure war unter der von Pfleiderer[8]) untersuchten größeren Zahl von Säuren diejenige, die am wenigsten das Lab bei der Käsebildung unterstützt, während Salzsäure die stärkste fördernde Wirkung hat.

Tabelle XXI.

Versuch mit Magensaft N und Kochsalzsalzsäuremilch.

Dauer des Versuchs in Stunden	5	20
Konzentration der Verdünnung	II = $^1/_{100}$ und III = $^1/_{1000}$	III und IV = $^1/_{10\,000}$
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Magensaftes in ccm	5^{-2}	5^{-3}
	4^{-2}	4^{-3}
	3^{-2}	3^{-3}
	2^{-2}	2^{-3}
	1^{-2}	1^{-3}
	9^{-3}	9^{-4}
	8^{-3}	8^{-4}
	7^{-3}	7^{-4}
	6^{-3} bis 1^{-3}	6^{-4} bis 1^{-4}

Wir setzten zu 100 ccm Milch 5 ccm KH_2PO_4-Lösung, die bei Titration gegen $^1/_{10}$-NaOH mit Phenolphthalein einen Titer von 10,5 hatte (pro ccm).

Tabelle XXII.

Kälberlabversuch mit KH_2PO_4-Milch (5:100) Titer 10,5.

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	20
Konzentration der Verdünnung	III = $^1/_{1000}$	IV = $^1/_{10\,000}$	V = $^1/_{100\,000}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1

Auch hier blieb das Zeitgesetz für das Kälberlab unangefochten bei dem ½- und 5-Stundenversuch; nach 20 Stunden hatten die angesetzten Verdünnungsproben keine Gerinnung bewirkt, doch trat eine solche beim Kochen ein, und zwar nur bis zu der durch den punktierten Strich bezeichneten Grenze, die dem Zeitgesetz entspricht.

Tabelle XXIII.

Versuch mit Magensaft N und KH_2PO_4-Milch (5 : 100) Titer 10,5.

Dauer des Versuchs in Stunden	½	5	20
Konzentration der Verdünnung	0, I, II	I, II, III	II, III
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Magensaftes in ccm	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}
	1^{-1}	1^{-2}	1^{-3}
	9^{-2}	9^{-3}	9^{-4}
	8^{-2}	8^{-3}	8^{-4}
	7^{-2}	7^{-3}	7^{-4}
	6^{-2}	6^{-3}	6^{-4}
	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}
	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}
	3^{-2}	3^{-3}	3^{-4}
	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}
	1^{-2}	1^{-3}	1^{-4}
	9^{-3}	9^{-4}	
	8^{-3}	8^{-4}	

Der Magensaftversuch N mit Phosphatmilch zeigte also keine Annäherung an das Zeitgesetz für den ½- und 5-Stundenversuch, kein Weiterschreiten der Gerinnung bei dem 20-Stundenversuch über die bei 5 Stunden erhaltene Grenze: Auch nachträgliches Kochen vermochte keine Gerinnung hervorzurufen.

Ebenso wie bei den Versuchen mit HCl-Milch probierten wir hier durch Steigerung des Säurezusatzes dem Zeitgesetz näher zu kommen. Wir setzten zu 100 Milch 9 KH_2PO_4-Lösung von dem Titer 15,5 und erhielten so eine Milch mit einem 2,7 mal größeren Säuregehalt wie bei dem vorigen Versuch.

Tabelle XXIV.

Versuch mit Magensaft Appel und KH_2PO_4-Milch (9 : 100) Titer 15,5.

Dauer der Versuchs in Stunden	1/2	5
Konzentration der Verdünnung	II = 1/100	III = 1/1000
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in ccm	4^{-3}	4^{-4}
	3^{-3}	3^{-4}
	2^{-3}	2^{-4}
	1^{-3}	1^{-4}
	9^{-4}	9^{-5}
	8^{-4}	8^{-5}
	7^{-4}	7^{-5}
	6^{-4}	6^{-5}
	5^{-4}	5^{-5}

Es war in diesem Fall eine Verschiebung sehr zu Ungunsten des Zeitgesetzes eingetreten.

Der Säuregrad wurde nun noch weiter gesteigert, durch Verwendung einer konzentrierten KH_2PO_4-Lösung vom Titer 17.

Von dieser Lösung konnte zu 10 ccm Milch 6,9 zutitriert werden, bis eine feine flockige Fällung auftrat. Zu 100 ccm Milch hätten also 69 ccm KH_2PO_4 zugesetzt werden müssen, um eine Säurefällung zu erhalten. Um diese auszuschließen, verwendeten wir Milch, die auf 100 ccm Milch 20 ccm KH_2PO_4 von dem Titer 17 enthielt, also einen 6,48 mal größeren Säurezusatz wie bei dem 1. Versuch (Tabelle XXIII).

Tabelle XXV.

Kälberlabversuch mit KH_2PO_4-Milch (20 : 100) Titer 17.

Dauer des Versuchs in Stunden	1/2	5	20
Konzentration der Verdünnung	III = 1/1000 u. IV = 1/10000	IV u. V = 1/100000	V u. VI = 1/1000000
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Labessenz in ccm	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}
	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}
	3^{-4}	3^{-5}	3^{-6}
	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6} ←
	1^{-4}	1^{-5}	1^{-6}
	9^{-5}	9^{-6}	9^{-7}
	8^{-5}	8^{-6}	8^{-7}
	7^{-5}	7^{-6}	7^{-7}

Auch hier zeigte sich wieder Giltigkeit des Zeitgesetzes für Lab bei 1/2 und 5 Stunden, doch war die mit $0{,}7^{-6}$ beschickte

Milch schon verdächtig — dagegen ging bei 20 Stunden die Gerinnung weit über die zu erwartende Grenze (siehe Pfeil).

Der Magensaftversuch N mit KH_2PO_4-Milch (20 : 100), Titer 17 zeigte für den $^1/_2$- und 20-Stundenversuch das Zeitgesetz giltig.

Tabelle XXVI.

Versuch mit Magensaft N und KH_2PO_4-Milch (20 : 100) Titer 17.

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5
Konzentration der Verdünnung	II = $^1/_{100}$	III = $^1/_{1000}$
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9
	8	8
	7	7
	6	6
	5	5
	4	4
	3	3
	2	2
	1	1

Auffallend war, daß bei dem 5-Stundenversuch die Gerinnung um eine Stelle über die zu erwartende Grenze weiter ging. Später wurde derselbe Versuch mit dem Magensaft Korak angestellt (mit anderer Milch). Das Resultat war insofern abweichend, als bei dem 5-Stundenversuch die Verdünnungen, die unterhalb der nach dem Zeitgesetz zu erwartenden Grenze lagen, halbflüssig geronnen waren, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle XXVII.

Magensaft Korak und KH_2PO_4-Milch (20 : 100) Titer 17.

Dauer des Versuchs in Stunden	$^1/_2$	5	
Konzentration der Verdünnung	II = $^1/_{100}$	III = $^1/_{1000}$	
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Verdünnung in $^1/_{10}$ ccm	9	9	
	8	8	
	7	7	
	6	6	
	5	5	← fest
	4	4	
	3	3	halbfl. →
	2	2	
	1	1	

Die gleichzeitig zur Kontrolle für 5 Stunden in den Eisschrank gestellte KH_2PO_4-Milch zeigte nach 5 Minuten langem Warmbad denselben halbflüssigen Zustand. Gleich nach der Bereitung in das Warmbad gebrachte KH_2PO_4-Milch blieb dagegen nach 5 Minuten flüssig, gerann sofort nach Labzusatz. Ebenso gerann die frisch bereitete Phosphatmilch beim Kochen ohne Labzusatz.

Um den Einfluß des KH_2PO_4 auf Milch ohne Labzusatz genauer zu bestimmen, stellten wir einen Reihenversuch an mit Zusätzen von 0,1 ansteigend um $^1/_{10}$ ccm bis 2,0 ccm KH_2PO_4 (Titer 13,5).

Tabelle XXVIII.

			Zahl der zu 10 ccm Milch zugesetzten $^1/_{10}$ ccm KH_2PO_4 (Titer 13,5)
	5 Min. Warmbad geronnen	nach 5 Stunden Eisschrank flüssig	20
			19
			18
			17
gekocht geronnen	5 Min. Warmbad flüssig		16
			15
			14
			13
			12
			11
			10
			9
			8
gekocht flüssig			7
			6
			5
			4
			3
			2
			1

Wenn man sich bei den Zusätzen zur Milch der Menge des primären Kaliumphosphats, die nach der Tabelle ohne Lab in 5 Stunden eine Gerinnung hervorruft (von 1,7 ccm an aufwärts zu 10 Milch), nicht zu sehr nähern will, bleiben nur solche Mengen übrig, die wie Tabelle XXIV zeigt, das Zeitgesetz nicht günstig beeinflussen.

In den folgenden Tabellen stellen wir noch einmal die eben noch geronnenen Grenzwerte der verschiedenen Versuche zusammen, um einen Überblick über den Einfluß der verschiedenen Zusätze auf das Zeitgesetz zu gewinnen. Zugleich wird dabei der gerinnungsfördernde Einfluß der Zusätze deutlich.

Tabelle XXIX.
Kälberlabversuche.

Zeit in Stunden	$^1/_2$	5
Ohne Zusatz	0,002	0,0003
$CaCl_2$ (20 Proz.) 10:100	0,0003	0,00004
HCl 2:100	0,0003	0,00002
HCl 3:100	0,00004	0,00002
KH_2PO_4 5:100 Titer 10,5	0,0002	0,0003

Eine wesentliche Alteration des Zeitgesetzes tritt also bei dem Kälberlabversuch nur bei Zusatz von HCl 3:100 ein.

Tabelle XXX.
Versuche mit Magensaft N.

Zeit in Stunden	$^1/_2$	5	20
Ohne Zusatz	0,07	0,01	0,007
HCl 2:100	0,004	0,006	
HCl 3:100	0,003	0,003	
KH_2PO_4 5:100	0,009	0,003	

Tabelle XXXI.
Versuche mit Magensaft Rühl.

Zeit in Stunden	$^1/_2$	5
Ohne Zusatz	0,2	0,06
$CaCl_2$	0,04	0,007
HCl 2:100	0,02	0,004

Da die Milch bei Chlorcalciumzusatz durch die bekannte Umwandlung der Phosphate beträchtlich angesäuert wird, so war die Möglichkeit vorhanden, daß die bewirkte Säuerung der Grund für die Gerinnungsförderung durch $CaCl_2$ sei. Dies zu entscheiden dienten folgende Versuche.

Es wurde zuerst durch $CaCl_2$-Zusatz die der Milch erteilte Säuerung bestimmt und gesehen, wieviel HCl, bezüglich KH_2PO_4 nötig seien, um der Milch die gleiche Säure zu geben. Die Titration erfolgte nach dem Vorschlage von Moritz (Deutsches Archiv f. klin. Medizin Bd. 80) unter Zusatz des gleichen Volums gesättigter NaCl-Lösung.

Tabelle XXXII.

Milch ccm	Zusatz zur Milch	Titration mit $^1/_{10}$ NaOH (Phenolphth.)	
		schwach rosa	rot
10	10 NaCl + 1 $CaCl_2$ (20 Proz.)	2,3	2,5
10	10 NaCl + 0,01 KH_2PO_4 (Titer 17)	2,4	2,6
10	10 NaCl + 0,5 $^1/_{10}$ Normal-HCl	2,3	2,5

Schon die Ergebnisse dieser Tabelle zusammen mit den Erfahrungen der früheren Versuche ließen erkennen, daß die Säuerung der Milch durch $CaCl_2$ nicht die gerinnungsfördernde Wirkung erklären könne. Dies wurde noch durch folgende Versuche bewiesen, wobei die Milch den gleichen Säuregrad: im 1. Versuch durch KH_2PO_4, im 2. durch HCl, im 3. durch $CaCl_2$, erhielt. Die Grenzwerte der Gerinnung waren sehr verschieden.

Tabelle XXXIII.
Magensaft Korak.

Art der Milch	Ohne Zusatz	KH_2PO_4 (Titer 17) 0,1 : 100	HCl (normal) 0,5 : 100	$CaCl_2$ (20 Proz.) 10 : 100
Menge des zu 10 ccm Milch zugesetzten Saftes in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9^{-1}	9^{-2}
	8	8	8^{-1}	8^{-2}
	7	7	7^{-1}	7^{-2}
	6	6	6^{-1}	6^{-2}
	5	5	5^{-1}	5^{-2}
	4	4	4^{-1}	4^{-2}
	3	3	3^{-1}	3^{-2}
	2	2	2^{-1}	2^{-2}
	1	1	1^{-1}	1^{-2}
			9^{-2}	

Trotzdem die Milch durch die drei verschiedenen Zusätze (KH_2PO_4, HCl, $CaCl_2$) den gleichen Säuretiter bekommen hatte, war die Gerinnungsförderung sehr verschieden: während sie bei KH_2PO_4 0,1 : 100 Milch null war, war sie bei HCl-Zusatz 0,5 : 100 über das zehnfache so stark wie ohne Zusatz, eine Beschleunigung der Gerinnung, die durch $CaCl_2$-Zusatz noch beträchtlich übertroffen wurde.

Die Wirkung des $CaCl_2$ beruht also nicht allein auf der hierdurch bewirkten Ansäuerung der Milch.

Ehe es nicht gelingt, einen gesetzmäßigen Verlauf der Verdünnungs- bzw. Zeitkurve bei dem Parachymosin zu finden, muß man sich zur quantitativen Bestimmung des Labfermentgehalts darauf beschränken, die bei bestimmter Temperatur in bestimmter Zeit zur Gerinnung eines bestimmten Milchvolumens nötige Fermentmenge (= Magensaft) anzugeben. Die Bedingungen müssen bei vergleichenden Versuchen so gewählt werden, daß sie immer, auch bei fermentarmen Säften, eine Gerinnung ermöglichen, anderseits ist es aus praktischen Gründen wünschenswert, die Wirkungszeit möglichst abzukürzen. Bezüglich der Temperatur erschien der Eisschrank oder das Kaltwasserbad, die nach Morgenroths Untersuchungen die konstantesten Resultate liefern, mit nachfolgendem kurzem Aufenthalt im Warmbad am geeignetsten. Die Hauptschwierigkeit lag darin, Bedingungen zu geben, unter denen in nicht zu langer Zeit auch anacide Magensäfte Milchgerinnung hervorrufen. Die geringe Labwirkung bei Säften mit fehlender Kongoreaktion ist allgemein bekannt; wir konnten sie durch folgende 5-Stundenversuche bestätigen.

Tabelle XXXIV.

5-Stundenversuch bei Achylien.

Magensaft	Thorn	Bilsing	Krug	Hildebrand
Kongo	—	—	—	—
Menge der zu 10 ccm Milch zugesetzten Saftmenge in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9	9
	8	8	8	8
	7	7	7	7
	6	6	6	6
	5	5	5	5
	4	4	4	4
	3	3	3	3
	2	2	2	2
	1	1	1	1

Die beiden ersten der zu dem Versuch verwandten Achylien (Thorn und Bilsing) stellten klassische Fälle „reiner“ Achylie dar, die schon jahrelang in Beobachtung der Klinik sind; die dritte (Krug) beruhte auf Carcinom, die vierte (Hildebrand) war eine nach wenigen Tagen vorübergehende, nach Alkoholabusus akut aufgetretene Achylie. Nur der Saft dieser letzteren rief in 5 Stunden eine Gerinnung hervor, die drei andern hatten keine milchkoagulierende Wirkung in dieser Zeit. Nach 24 Stunden waren die mit 0,9 und 0,8 ccm Saft von Thorn beschickten Gläser fest geronnen, die übrigen noch flüssig.

Eine Wiederholung des Versuchs mit einer Milch, der auf 100 ccm 9 Kaliumbiphosphatlösung vom Titer 15,5 zugesetzt war, ergab in 5 Stunden eine Gerinnung.

Tabelle XXXV.

5-Stundenversuch bei Achylien mit KH_2PO_4-Milch.

Magensaft	Thorn	Bilsing	Hildebrand
Menge des zu 10 ccm 9proz. KH_2PO_4-Milch zugesetzten Saftes in ccm	9^{-1}	9^{-1}	9^{-2}
	8^{-1}	8^{-1}	8^{-2}
	7^{-1}	7^{-1}	7^{-2}
	6^{-1}	6^{-1}	6^{-2}
	5^{-1}	5^{-1}	5^{-2}
	4^{-1}	4^{-1}	4^{-2}
	3^{-1}	3^{-1}	3^{-2}
	2^{-1}	2^{-1}	2^{-2}
	1^{-1}	1^{-1}	1^{-2}

Wir konstatierten eine Koagulation in allen Versuchsfällen nach 5 Stunden. Die umstrittene Frage, ob an dieser Gerinnung eine Überführung des Profermentes in das Ferment durch die Säure teil hat, können wir hierbei ganz unberücksichtigt lassen.

Eine Salzsäuremilch 2 n-HCl : 100 Milch, wie wir sie in früheren Versuchen verwendet hatten, ließ eine noch weitergehende Gerinnungsförderung erwarten. In der Tat erhielten wir bei allen beobachteten achylischen Säften eine Gerinnung schon in $^1/_2$ Stunde mit 2proz. HCl-Milch. (Siehe Tabelle XXXVI auf S. 112.)

Nachdem bei diesen vier Achylien die Verwendung von 2proz. HCl-Milch in $^1/_2$ Stunde eine Gerinnung ergeben hatte, erschien diese Methode geeignet zur Messung der milchkoagulierenden Kraft auch der fermentarmen Säfte. Um für saure Säfte entsprechende, die Eigenwirkung der freien HCl ausschaltende Bedingungen zu schaffen, gingen wir so vor, daß wir durch Zusatz

Tabelle XXXVI.

$^1/_2$-Stundenversuch bei Achylie mit 2 proz. HCl-Milch.

Magensaft	Thorn	Bilsing	Krug	Stöhr
Kongo	—	—	—	—
Menge des zu 10 ccm 2 proz. HCl-Milch zugesetzten Saftes in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9	9
	8	8	8	8
	7	7	7	7
	6	6	6	6
	5	5	5	5
	4	4	4	4
	3	3	3	3
	2	2	2	2
	1	1	1	1

von Normal- bzw. $^1/_{10}$-Normal-HCl die Verdünnung I auf die Acidität 100 brachten, bei den übrigen Verdünnungen als Verdünnungsflüssigkeit $^1/_{10}$-Normal-HCl verwendeten und so immer Flüssigkeiten mit der Acidität 100 erhielten und die zuzusetzenden $^1/_{10}$ ccm des verdünnten Saftes mit $^1/_{10}$-Normal-HCl auf 1 ccm auffüllten. Bei Verwendung einer HCl-Milch 1:100 erhielten wir in je 10 ccm Milch nach Zusatz des verdünnten, mit $^1/_{10}$-Normal-HCl auf 1 ccm aufgefüllten Saftes einen Aciditätsgrad, der der 2 proz. HCl-Milch bei Achylien entsprach.

Folgende Beispiele mögen das näher erläutern:

Magensaft Müller, freie HCl 47.

		Gehalt an $^1/_{10}$-Normal-HCl
Verdünnung I (= $^1/_{10}$)	5 ccm Saft	2,3
	4,77 n-HCl	47,7
	40,23 H_2O	0
	50 ccm	50,0

Verdünnung II (= $^1/_{100}$) 1 ccm von I + 9 $^1/_{10}$-n-HCl
III (= $^1/_{1000}$) 1 ccm von II + 9 $^1/_{10}$-n-HCl
IV (= $^1/_{10000}$) 1 ccm von III + 9 $^1/_{10}$-n-HCl.

Nachdem der $^1/_2$stündige Tastversuch eine Gerinnung in den mit 1 ccm von I und II zu 10 ccm 1 proz. HCl-Milch beschickten Gläsern, keine in den mit 1 ccm von III und IV beschickten Gläsern ergeben hatte, wurde ein Reihenversuch angestellt, bei dem 9 Gläser mit $^9/_{10}$ absteigend bis $^1/_{10}$ ccm von der Verdünnung II versetzt, bis auf 1 ccm mit $^1/_{10}$-Normal-HCl aufgefüllt und dann mit je 10 ccm 1 proz. HCl-Milch beschickt wurden.

Die Gläser mit Zusatz von $^{3}/_{10}$ ccm an aufwärts gaben nach $^{1}/_{2}$ Stunde Gerinnung.

Tabelle XXXVII.

$^{1}/_{2}$-Stundenversuch bei acidem Saft mit Verdünnung und Auffüllung durch $^{1}/_{10}$-n-HCl.

Zusatz zu 10 ccm 1proz. HCl-Milch	Menge der Verdünnung II in $^{1}/_{10}$ ccm	Menge der Auffüllung (= $^{1}/_{10}$-n-HCl) in $^{1}/_{10}$ ccm
	9	1
	8	2
	7	3
	6	4
	5	5
	4	6
	3	7
	2	8
	1	9

Rein theoretisch betrachtet sollte man dasselbe Resultat erwarten, wenn man nach Neutralisation des Magensaftes 2proz. HCl-Milch verwendet, da man der Milch denselben Säuregrad erteilt. Dies ist nicht der Fall, was seinen Grund wohl in der großen Empfindlichkeit des Labfermentes gegen Alkalien hat.

Versuch mit neutralisiertem Magensaft Müller und 2proz. HCl-Milch.

Verdünnung I: 5 ccm Saft + 2,3 ccm $^{1}/_{10}$-NaOH + 42,7 H_2O
„ II: 1 ccm von I + 9 H_2O
„ III: 1 ccm von II + 9 H_2O
„ IV: 1 ccm von III + 9 H_2O.

Tabelle XXXVIII.

Die von der Verdünnung II zu 10 ccm 2proz. HCl-Milch zugesetzte Menge in $^{1}/_{10}$ ccm:

9	8	7	6	5	4	3	2	1

Trotz der gleichen Säurewerte war bei neutralisiertem Saft eine ganz bedeutende Gerinnungshemmung aufgetreten: Grenzwert $^{9}/_{1000}$ gegenüber $^{3}/_{1000}$ bei dem 1. Versuch.

Dasselbe Resultat ergab folgender Versuch, der außerdem zeigte, wie wenig Einfluß eine Veränderung des freien HCl-Wertes in den in Magensäften vorkommenden Grenzen (Acidität 1 bis 100) außer bei ihrer völligen Aufhebung (= Neutralisation) hat.

Von dem Saft Wommelsdorf mit 64 freier HCl wurden Verdünnungen mit einer Acidität von 100, 50 und 0 hergestellt auf folgende Weise:

Tabelle XXXIX.

Bezeichnung	A	B	C
Magensaft	5 (= 0,32 n-HCl)	5 (= 3,2 $\frac{n}{10}$-HCl)	5 (= 3,2 $\frac{n}{10}$-HCl)
Chem. Zusatz	0,68 n-H Cl	1,8 $^1/_{10}$-n-H Cl	3,2 $^1/_{10}$-n-Na OH
Wasser	4,32	3,2	1,8
Verdünnung I = $^1/_2$	10 ccm Ac. 100	10 ccm Ac. 50	10 ccm Ac. 0

Die Verdünnungen II = $^1/_{20}$ wurden in den drei Fällen mit je 1 ccm von A, B und C und je 9 ccm $^1/_{10}$ Normal-HCl hergestellt, als Milch wurde 1 proz. HCl-Milch verwendet.

Tabelle XL.

$^1/_2$ Stde.-Versuch.

Stammlösung	A	B	C
Die von der Verdünnung II = $^1/_{20}$ zu je 10 ccm 1 proz. H Cl-Milch zugesetzte Menge in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1

5 Stdn. Versuch.

Stammlösung	A	B	C
Die von der Verdünnung II = $^1/_{20}$ zu je 10 ccm 1-proz. H Cl-Milch zugesetzte Menge in $^1/_{10}$ ccm	9	9	9
	8	8	8
	7	7	7
	6	6	6
	5	5	5
	4	4	4
	3	3	3
	2	2	2
	1	1	1

Die Veränderung des freien HCl-Wertes (100 und 50) hatte bei dem $^1/_2$- und 5-Stundenversuch keinen Einfluß; Aufhebung der freien HCl dagegen durch Neutralisation hatte eine gerinnungshemmende Wirkung.

Daß eine Veränderung des freien HCl-Wertes innerhalb der praktisch vorkommenden Grenzen, also etwa vom Auftreten der Kongoreaktion an bis zur Acidität 100 bei dieser Versuchsanordnung keinen Einfluß hat, wird noch verständlicher, wenn man sich klarmacht, wie durch die Verdünnung die Säuredifferenz der verschiedenen Zusätze prozentisch immer kleiner wird, so daß bei dem obigen Versuch (Wommelsdorf) die Säureunterschiede folgende sind:

Tabelle XLI.

	A	B	C	Die von Verdünnung II zugesetzten $^1/_{10}$ ccm
Salzsäuregehalt der einzelnen Labversuche von Tab. XL in ccm $\frac{n}{10}$-HCl	1,9	1,855	1,81	9
	1,8	1,76	1,72	8
	1,7	1,665	1,63	7
	1,6	1,57	1,54	6
	1,5	1,475	1,45	5
	1,4	1,38	1,36	4
	1,3	1,285	1,27	3
	1,2	1,19	1,18	2
	1,1	1,095	1,09	1

Hätten wir bei diesem Versuch die einzelnen Verdünnungen mit $^1/_{10}$-Normal-HCl je auf 1 ccm aufgefüllt wie bei dem oben mitgeteilten Versuch (Tabelle XXXVII), so wären die Aciditätsunterschiede noch geringer geworden. (Siehe Tabelle XLII auf Seite 118.)

Es folgt hieraus, daß man bei der oben geschilderten Versuchsanordnung: Herstellung und Auffüllung der Verdünnung auf 1 ccm mit $^1/_{10}$-Normal-HCl, die natürliche Verschiedenheit der Aciditätsgrade bei kongopositiver Reaktion unberücksichtigt lassen kann.

Wenn wir dies bei der eben geschilderten Versuchsanordnung tun können, können wir statt dessen ebenso gut eine 2proz. HCl-Milch als Gerinnungsobjekt benutzen, analog den Versuchen bei achylischen Säften und die Verdünnungen mit Wasser herstellen. Man ist umsomehr zu dieser Außerachtlassung der

Saftacidität berechtigt, als gerade mit höherer Acidität, wobei besonders eine Gerinnungsförderung durch die Magensäure in Betracht kommt, gewöhnlich ein relativer Fermentreichtum einhergeht, welcher beträchtliche Verdünnungen (II = $^1/_{100}$) nötig macht.

Tabelle XLII.

	A	B	C	Die von Verdünnung II zugefügten $^1/_{10}$ ccm
Salzsäuregehalt derselben Versuche wenn (wie in Versuch XXXVII) mit $\frac{n}{10}$-HCl auf 11 ccm aufgefüllt worden wäre.	2	1,955	1,91	9
	2	1,96	1,92	8
	2	1,965	1,93	7
	2	1,97	1,94	6
	2	1,975	1,95	5
	2	1,98	1,96	4
	2	1,985	1,97	3
	2	1,99	1,98	2
	2	1,995	1,99	1

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß die Milch möglichst frisch mit Senföl versetzt werden muß, da eine geringe, mit Lackmus oder durch den Geschmack kaum nachweisbare bakterielle Säuerung schon erhebliche Gerinnungsförderung ergibt und außerdem den Zusatz von 2proz. n-HCl nicht mehr gestattet. Es empfiehlt sich, die größere Milchmenge (10 ccm) zu der kleineren Saftmenge ($^1/_{10}$ bis $^9/_{10}$ ccm) möglichst rasch zuzugießen und dann zu schütteln, da so die gleichmäßigste Mischung zu erzielen ist.

Fassen wir zum Schluß die Ergebnisse unserer Untersuchungen noch einmal zusammen, so sind es folgende:

1. Das Zeitgesetz der Labung (Labmenge × Gerinnungszeit = C) findet für das Parachymosin keine Anwendung, auch nicht bei der Fuld-Morgenrothschen Versuchsanordnung.

2. Auch bei Ausschaltung eines verschiedenen Säuregehaltes in den Verdünnungen durch Herstellen der Verdünnungen mit gekochtem Saft und Auffüllen der verschiedenen zuzusetzenden Saftmengen mit gekochtem Saft auf 1 ccm ist das Zeitgesetz nicht giltig.

3. Die relative Abnahme der milchkoagulierenden Wirkung bei längerer Versuchsdauer hat nicht ihren Grund in den dazu nötigen Verdünnungsflüssigkeiten.

4. Der Zusatz von Calciumchlorid und Säure hat neben dem gerinnungsfördernden Einfluß auch eine Beeinflussung der zeitlichen Verhältnisse zur Folge. Für eine beschränkte Zeit (5 Stunden) gibt 2 ccm Normal-HCl auf 100 ccm Milch eine erhebliche Annäherung an das Zeitgesetz des Kälberlabs.

5. Zur quantitativen Bestimmung empfehlen wir als praktisch und für alle, auch achylische Magensäfte verwendbar: die Bestimmung der Saftmenge, die in 10 ccm einer 2 Proz. Normal-HCl enthaltenden Milch nach $^1/_2$ stündiger Einwirkung im Eisschrank mit anschließendem, 5 Minuten langem Aufenthalt im Warmbad Gerinnung hervorruft.

Herrn Privatdozenten Dr. Volhard spreche ich für die Anregung zu dieser Arbeit und reiche Unterstützung meinen herzlichen Dank aus.

Literaturverzeichnis.

1) Fuld, Über Milchgerinnung durch Lab. Asher und Spiro, Ergebnisse der Physiologie **1**, 1 (1902).

2) Fuld, Über die Milchgerinnung durch Lab. Diese Beiträge **4** (1902).

3) Bang, Über Parachymosin, ein neues Labferment. Pflügers Archiv **79** (1900).

4) Pawlow und Parastschuk, Über die ein und demselben Eiweißfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 5 u. 6 (1904).

5) Fuld, Untersuchungen über das Labferment. Münch. med. Wochenschrift 1902.

6) Morgenroth, Über den Antikörper des Labenzyms. Centralbl. f. Bakteriologie I. Abteilg. **26** (1899).

7) Lörcher, Über Labwirkung. Pflügers Archiv **69** (1898).

8) Pfleiderer, Ein Beitrag zur Pepsin- und Labwirkung. Pflügers Archiv **66** (1897).

VIII.

Über die Volhardsche Methode der quantitativen Pepsin- und Trypsinbestimmung durch Titration.

Von Dr. med. **Walter Löhlein**, Volontärassistent der Klinik.

Aus der medizinischen Klinik in Gießen. (Stellvertr. Direktor: Privatdozent Dr. Franz Volhard.)

I.

Der Zweck der im folgenden mitgeteilten Versuche, die der Verfasser auf Anregung des Herrn Privatdozenten Dr. Volhard im Laboratorium der medizinischen Klinik zu Gießen ausgeführt hat, war in erster Linie, nähere Angaben über die praktische Anwendungsweise der von Volhard im Jahre 1903 angegebenen (Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49) Methode der quantitativen Pepsinbestimmung zu geben, sodann die Übertragbarkeit dieser Methode in entsprechend abgeänderter Form auf den quantitativen Nachweis tryptischer Wirkung darzutun.

Der Wert der quantitativen Bestimmung der peptischen Kraft eines Magensaftes als eines diagnostischen Hilfsmittels ist zur Zeit ein immerhin noch bescheidener und steht in dieser Hinsicht weit zurück hinter dem quantitativen Säurenachweis; doch ist dies wohl zum Teil dadurch zu erklären, daß für den letzteren außerordentlich bequeme und doch hinreichend genaue Methoden zur Verfügung stehen, welche es — auch dem praktischen Arzte — ermöglichen, sich mit geringer Mühe einen Einblick in die Säureproduktion eines Magens zu verschaffen. Ganz anders aber steht es mit dem quantitativen Nachweis des Pepsins: hier gibt es kaum eine Methode, welche den wünschenswerten Grad von Genauigkeit mit der notwendigen Einfachheit der Ausführung verbände, um allgemein und regelmäßig Anwendung finden zu können.

An Versuchen, diesen Mangel einer einfachen und doch exakten Methode zu beseitigen, hat es nicht gefehlt.

Die älteren Verfahren, wie die von Leube, Grützner, Jaworski begnügten sich mit einer annähernden Schätzung der Fermentmenge und gingen meist von der unbewiesenen Voraussetzung aus, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Geschwindigkeit der Eiweißverdauung direkt proportional sei der relativen Pepsinmenge.

Umständlich, aber genau ist die von E. Schütz [Zeitschrift für physiol. Chemie 9] angegebene Methode, welche zur Entdeckung der Schütz-Borissowschen Regel führte. Schütz verfährt folgendermaßen:

Es werden in 100 ccm Gesamtflüssigkeit 1 g gelöstes Albumin mit 0,25 bis 0,3 Proz. HCl und dem zu prüfenden Magensaft 16 Stunden bei 37,5° der Verdauung unterworfen; gleichzeitig wird ein blinder Versuch mit derselben Menge Magensaft und Salzsäure ohne Albumin angestellt. Nun wird die Verdauungsmischung mit Ferriacetat gefällt; die Albumosen bleiben gelöst. Es wird auf 50 ccm eingedampft, sodann die polarimetrische Ablenkung unter Abzug des beim blinden Versuch erhaltenen Wertes bestimmt.

Die Verfahren von Oppler, Salkowski und Croner, sowie das von J. Schütz beruhen darauf, daß mittels der Kjeldahlschen Methode der in einer Eiweißlösung vorhandene durch Kochen koagulierbare und der nicht durch Kochen koagulierbare Stickstoff vor und nach der Pepsinwirkung bestimmt werden.

Ebenfalls recht umständlich und darum klinisch wohl nicht im Großen anwendbar sind gewichtsanalytische Methoden, welche den unverdauten Eiweißrest ausfällen und bestimmen. Hierher gehört auch die von Thomas und Weber [Zentralblatt f. Stoffwechsel- und Verdauungskrankheiten 2, 14 (1901)] angegebene exakte aber zeitraubende Methode. Diese lassen das Pepsin bei 40° auf eine salzsaure Kaseinlösung einwirken. Nach einer Stunde wird die Verdauung durch Zusatz einer 20proz. Natriumsulfatlösung unterbrochen. Das unverdaute Kasein fällt aus, wird auf gewogenem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet, gewogen. Ein blinder Versuch ohne Pepsin dient zur Bestimmung des ursprünglichen Kaseingehaltes.

Im Gegensatz zu diesen zwar recht genauen aber durch ihre Umständlichkeit für eine breitere Verwendung in der Klinik und gar in der Praxis wenig geeigneten Verfahren stehen zwei leicht ausführbare Methoden zur Verfügung, denen aber wiederum von vielen Seiten der Vorwurf mangelnder Genauigkeit gemacht wird: die Methoden von Hammerschlag und Mett.

Ersterer schlägt folgendes einfache Verfahren vor:

Von einer etwa 1proz. Eiweißlösung, die etwa 4 Proz. freie Salzsäure enthält, werden zwei Proben von je 10 ccm abgemessen; zu der einen, die als Kontrollprobe dient, fügt man 5 ccm aq. dest., zu der anderen 5 ccm Magensaft hinzu und läßt beide Proben eine Stunde im Brutofen stehen. Sodann wird in beiden der Eiweißgehalt mit dem Esbachschen Albuminimeter bestimmt. Die mit Wasser versetzte Probe gibt den ursprünglichen Eiweißgehalt der Mischung an; die Differenz zwischen beiden ist gleich der Menge des verdauten Eiweißes. Diese kann dann leicht in Prozenten ausgerechnet werden.

Wohl am verbreitetsten, weil sehr einfach, ist die von Mett angegebene Art der Pepsinbestimmung, für welche auch, im Gegensatz zu den beiden zuletzt erwähnten Methoden, die Giltigkeit der Schützschen Regel erwiesen ist. Koaguliertes Eiereiweiß wird in Glaskapillaren 10 Stunden lang der Pepsinverdauung ausgesetzt, die Länge des unverdaut gebliebenen Eiweißzylinders mit der Lupe abgelesen und von der ursprünglichen Länge abgezogen. Gegen dieses seiner bequemen Ausführbarkeit wegen sehr be-

liebte Verfahren sind neuerdings erhebliche Bedenken geltend gemacht worden. Nierenstein und Schiff (Archiv für Verdauungskrankheiten Bd. 8) wiesen nach, daß bei Anwendung des Mettschen Verfahrens auf unverdünnten menschlichen Magensaft das Schütz-Borissowsche Fermentgesetz sich nicht bestätigt und erklärten dies aus einer Behinderung der Eiweißverdauung durch Kohlehydrate und Kochsalz. Nierenstein und Schiff konnten nun allerdings nachweisen, daß durch eine 16fache Verdünnung des menschlichen Magensaftes jeglicher hindernde Einfluß eliminiert werden kann. Es ergibt sich aber hierdurch naturgemäß eine starke Herabsetzung der Verdauungslänge im Mettschen Eiweißzylinder, in solchem Maße, daß Nierenstein und Schiff als größtmöglichen Wert bei 16facher Verdünnung eine Verdauungslänge von nur 4 mm fanden; es liegt auf der Hand, daß unter diesen Umständen Fermentmengen geringeren Grades der Beobachtung nicht zugänglich oder wenigstens nicht mit einiger Zuverlässigkeit meßbar sind. Hierin aber liegt ein großer Nachteil der Mettschen Methode auch in ihrer von Nierenstein und Schiff empfohlenen Modifikation, denn gerade bei fermentarmen Magensäften wird eine zuverlässige quantitative Pepsinbestimmung wünschenswert sein.*)

Die im vorstehenden gegebene kurze Schilderung der wesentlichen zur Zeit üblichen Methoden der quantitativen Pepsinbestimmung zeigt, daß ihnen im allgemeinen zwei Mängel anhaften: Ein Teil der Verfahren bietet zwar eine große Exaktheit der Resultate, vielleicht größer als sie für klinische Zwecke erforderlich ist, wird aber durch eine umständliche Technik zu mühsam und zeitraubend, um eine regelmäßige Anwendung finden zu können, während andere in dem Bestreben nach Vereinfachung die wünschenswerte Genauigkeit und damit die Verwendbarkeit bei fermentarmen Magensäften preisgeben.

Beide Nachteile vermeidet die von Volhard angegebene titrimetrische Methode der quantitativen Pepsinbestimmung. Schon vordem war von Meunier (Comptes rendus des séances d. l. soc. de biologie 1901) ein titrimetrisches Verfahren angegeben worden: Der zu untersuchende Magensaft (14 ccm) wird mit Salzsäure (0,4 ccm pur.) und 1 g Kasein versetzt und geschüttelt; nachdem sich das Kasein abgesetzt hat, entnimmt man von der klaren Flüssigkeit 2 ccm und bestimmt deren Gehalt an freier Salzsäure. Die übrigen 10 ccm mit dem ungelösten Kasein bleiben 24 Stunden im Wasserbad von 40°. Dann wird wiederum in 2 ccm Filtrat die freie HCl bestimmt. Da durch die Pepsinverdauung Salzsäure an Eiweiß gebunden wird, drückt die Abnahme des Wertes für freie Säure den Grad der Pepsinwirkung aus.

Demgegenüber geht Volhard von der schon oben erwähnten gewichtsanalytischen Methode von Thomas und Weber aus.

*) Über die von Bettmann und Schröder neuerdings angegebene „Schaummethode“ [Archiv für Verdauungskrankheiten 10, 6] stehen mir keine Erfahrungen zu Gebote.

Diese basiert, wie wir sahen, auf der Erfahrung, daß reines, unverändertes Kasein in Verdauungssalzsäure gelöst, durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Setzt man also unter sonst gleichen Bedingungen einer bestimmten, gleichen Menge Kaseinlösung verschiedene Fermentmengen zu und läßt sie gleich lange im Wasserbad von 40° auf die Eiweißlösung einwirken, so wird der durch Zusatz von Natriumsulfat ausgefällte Rückstand um so geringer sein, je weniger Kasein unverdaut geblieben, d. h. je mehr durch die Fermentwirkung peptonisiert worden ist: Je größer der Rückstand, desto geringer die Fermentmenge unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Auf Grund dieser Erwägung sammeln Thomas und Weber den Niederschlag auf gewogenem Faltenfilter, waschen ihn mit destilliertem Wasser aus, trocknen und wägen ihn. Die Gewichtsdifferenz der Rückstände aus einem pepsinhaltigen und einem pepsinfreien Versuch dient also hier als Maß für die peptische Wirkung.

Die Umständlichkeit dieser Gewichtsbestimmung vermeidet Volhard durch Titration der Filtrate. Er ging von der Annahme aus, daß bei fortschreitender Peptonisierung der Kaseinlösung die Acidität des Filtrates zunehmen müsse, indem die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone das Filter passieren. Seine Versuche ergaben, daß bei Anwendung der gleichen Mengen derselben sauren Kaseinlösung ohne Pepsinzusatz die Acidität des Filtrates stets konstant und viel kleiner war, als dem wahren Säuregehalt der Stammlösung entsprach. Daraus geht hervor, daß unter gleichen Versuchsbedingungen im Kaseinniederschlag stets die gleiche Menge Salzsäure eingeschlossen bleibt, und nur die freie Salzsäure ins Filtrat übergeht. Man ist somit berechtigt, einen über die als konstant festgestellte Acidität der betreffenden Stammlösung hinausgehenden Säurewert auf die ins Filtrat übergegangenen salzsauren Peptone zu beziehen, und aus dem Aciditätszuwachs auf den Verdauungsgrad zu schließen.

Dementsprechend verhalten sich, wie Volhard in der oben zitierten Arbeit erwähnt, die Rückstände umgekehrt proportional der Acidität der Filtrate; und Volhard fand, daß sich die Aciditätszunahmen der Filtrate proportional den Quadratwurzeln aus dem Produkt von Fermentmenge mal Verdauungszeit verhielten, also dieselbe Regel, die Schütz und Huppert für die sekundären Albumosen bei der Pepsinverdauung gefunden hatten.

Herr Dr. Volhard hat mir gestattet, einige seiner früheren, noch nicht veröffentlichten Versuche an dieser Stelle mitzuteilen.

Als Stammkaseinlösung diente die von Thomas und Weber beschriebene salzsaure Lösung von 50 g Kasein in 1000 ccm verdünnter Salzsäure, enthaltend 70 ccm normal-HCl.

3. Versuch.

Versuchsanordnung: 100 Kaseinlösung, mit 150 ccm Wasser vorgewärmt, werden mit 0,1, 0,4, 0,9 ccm Magensaft (Acidität 59 : 87) eine Stunde digeriert, danach wird im Meßzylinder auf 300 ccm aufgefüllt und mit 100 ccm 20proz. Natriumsulfatlösung das Kasein gefällt. 200 ccm Filtrat der ohne Magensaftzusatz gefällten Stammlösung hatten für Phenolphthalein die Acidität 19,15. 200 ccm Filtrat von der Probe mit

1. 0,1 Saft = 22,25 — 19,15 — Saftacid. = 0,043 = **3,06** Aciditätszuwachs
2. 0,4 „ = 25,5 — 19,15 — „ = 0,17 = **6,18** „
3. 0,9 „ = 28,5 — 19,15 — „ = 0,387 = **8,96** „

Die Kaseinniederschläge werden auf gewogenem Filter gesammelt und ausgewaschen (sehr mühsam), nach vollständiger Trocknung noch einmal gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Gewicht des Stammlösungsniederschlags A =	4,104 g
„ „ Niederschlags von 1.	3,607 „
„ „ „ „ 2.	3,053 „
„ „ „ „ 3.	2,585 „
Verdaut wurden also von 0,1 ccm A — 1 =	0,497 „
„ 0,4 „ A — 2 =	1,051 „
„ 0,9 „ A — 3 =	1,519 „

Konstante berechnet: $\frac{A-1}{\sqrt{f}} = \mathbf{0{,}497}$; entsprechende Acid.: $\frac{3{,}06}{1} = \mathbf{3{,}06}$

$\frac{A-2}{\sqrt{f}} = \mathbf{0{,}525}$ „ „ $\frac{6{,}18}{2} = \mathbf{3{,}09}$

$\frac{A-3}{\sqrt{f}} = \mathbf{0{,}506}$ „ „ $\frac{8{,}96}{3} = \mathbf{2{,}99}$

6. Versuch.

Magensaft stark verdünnt (2 : 100 aq.); Titration von 150 ccm Filtrat mit Alizarin.

Die Aciditätszunahmen betrugen für:

1.	1 ccm Saft	0,9 : 1 =	0,9
2.	4 „ „	2,2 : 2 =	1,1
3.	9 „ „	5,73 : 3 =	**1,91**
4.	16 „ „	8,0 : 4 =	**2,0**
5.	25 „ „	9,5 : 5 =	**1,9**
6.	36 „ „	10,83 : 6 =	**1,8**

7. Versuch.

Versuchsanordnung: Es werden die Verdauungsgemische wie oben behandelt und 300 ccm Filtrat mit Rosolsäure titriert. Während der 2. Stunde war einige Zeit die Gasflamme unter dem Wasserbad verlöscht, die Temperatur von 40 auf 37° gesunken.

1.	1,2 ccm Saft 1 Stunde verdaut,	Ac. 38,2 — 30 — 0,675 =	**7,5**	
2.	0,6 „ „ 2 Stunden „	Ac. 36,9 — 30 — 0,34 =	**6,6**	
3.	0,4 „ „ 3 „ „	Ac. 37,8 — 30 — 0,22 =	**7,6**	
4.	2,4 „ „ 1 Stunde „	Ac. 42,5 — 30 — 1,35 =	**11,1** : $\sqrt{2}$ =	**7,8**
5.	1,2 „ „ 2 Stunden „	Ac. 40,5 — 30 — 0,67 =	**9,8** : $\sqrt{2}$ =	**6,9**
6.	0,8 „ „ 3 „ „	Ac. 40,5 — 30 — 0.45 =	**10,0** : $\sqrt{2}$ =	**7,1**

Acidität der Stammlösung allein für 300 Filtrat = 30,0.

Wir finden demnach da, wo p . f gleich ist, auch die Aciditätszunahmen fast gleich, und da, wo sich die Produkte $p . f : p_1 . f_1 = 1 : 2$ verhalten, die Aciditätszunahmen im Verhältnis von $1 : \sqrt{2}$, oder $\frac{v}{\sqrt{f . t}}$ nahezu konstant.

13. und 14. Versuch.

Es werden 200 ccm Filtrat mit Alizarin titriert. Im folgenden sind nur die aus 2 Versuchsserien, die mit demselben Magensaft angestellt wurden, gewonnenen Aciditätszunahmen zusammengestellt, um Raum zu sparen.

Saftmenge in ccm	Zeit in Stunden	Aciditäts-zunahme	f . t	$\frac{v}{\sqrt{f.t}}$
0,25	1	2,21	0,25	4,4
0,125	2	2,6		5,2
0,125	4	4,9	0,5	6,9
0,5	1	4,1		5,8
0,25	4	6,01	1	6,0
0,5	2	6,82		6,8
0,25	4	6,5		6,5
1,0	1	6,94		6,9
2,0	1	9,98	2	7,0
1,0	2	9,99		7,1
0,5	4	9,82		6,9
1,0	3	10,24	3	5,9
3,0	1	9,82		5,7
3,0	1	12,42		7,2
1,5	2	12,16		7,0
0,75	4	11,53		6,7
1,0	4	14,74	4	7,4

Störend und einer weiteren Verbreitung der Methode nicht günstig waren zwei Umstände, die noch eine Verbesserung wünschenswert machten. Einmal war die Herstellung der sauren Kaseinlösung nicht ganz leicht, und selbst dem Geübten konnte es passieren, daß bei Überschreitung des Temperaturoptimums von etwa 70° die Lösung plötzlich gelatinierte.

Zum andern machte die Wahl des Indikators Schwierigkeiten. Volhard legte anfangs Wert darauf, nur die Salzsäure des Filtrates zu titrieren. Er hatte aber gefunden, daß die Peptone die Acidität für Phenolphthalein ganz beträchtlich in die Höhe treiben. Diese haben

neben ihrer Basennatur den Charakter von schwachen organischen Säuren, welche auf Indikatoren der II. Gruppe wie Lackmus, Alizarin, Nitrophenol nicht sauer oder schwach alkalisch reagieren. Bei Gegenwart von Peptonen ist deshalb gegen Ende der Titration die Reaktion für diese Indikatoren stark alkalisch, Phenolphthalein schlägt aber erst dann in rot um, wenn alle organischen Säuren neutralisiert sind und freies Alkali vorhanden ist.

Um diese Eigenschaft der Peptone möglichst auszuschalten, benutzte Volhard schließlich das Alizarin als Indikator, doch ist der Umschlag bei Gegenwart von größeren Peptonmengen auch nicht scharf.

Beide Schwierigkeiten sind inzwischen beseitigt worden. Bezüglich des Indikators stellte sich heraus, daß das Wirkungsgesetz nicht beeinträchtigt wird, wenn man mit Phenolphthalein titriert, d. h. wenn man nicht nur den Zuwachs an HCl, sondern zugleich den Zuwachs an Peptonen mittitriert. Es geht daraus als wahrscheinlich, wenn auch noch nicht streng bewiesen hervor, daß die im Laufe der Pepsinverdauung gebildeten Verdauungsprodukte annähernd gleiches Alkalibindungsvermögen besitzen.

Bezüglich der Stammlösung waren Thomas und Weber eifrig bemüht, einen leichter herzustellenden Ersatz zu schaffen. Der Wunsch von Herrn Dr. Volhard, die alkalische Kaseinlösung zum Zwecke der titrimetrischen Trypsinbestimmung in die saure überführen zu können, veranlaßte Herrn Dr. Weber, ein derartiges Verfahren auszuarbeiten, und seine neue Modifikation, nach welcher ein und dieselbe alkalische Stammlösung für die Pepsin- wie für die Trypsinbestimmung verwendbar ist, läßt an Einfachheit nichts mehr zu wünschen übrig.

Als Objekt für die peptische Wirkung dient also neuerdings die von Thomas und Weber empfohlene, ursprünglich für deren Trypsinmethode angegebene Na-Kaseinlösung, deren Herstellung nach Weber zweckmäßig in folgender Weise geschieht:

„100 g feinkörniges oder gemahlenes Kasein werden mit 1 Liter aq. dest. unter Schütteln eingeweicht; sodann gibt man 80 ccm n-NaOH zu und füllt mit aq. dest. auf 2000 auf; man wärmt langsam an bis zur vollkommenen Lösung und erhitzt dann rasch auf 85 bis 90°, um eventuelle Spuren proteolytischer Enzyme unwirksam zu machen; nach dem Abkühlen setzt man einige Tropfen Toluol zu und verkorkt gut. Die Lösung hält sich in dieser Weise unbegrenzt lange. Auch kann direkt Nutrose oder Plasmon also Na-Kasein genommen werden*).“

---

*) Zitat einer noch nicht im Druck erschienenen Mitteilung des Herrn Dr. Weber.

Dies letztere ist bei Anwendung der Volhardschen Methode, wie ich mich überzeugen konnte, nicht ratsam; einmal ist, um in der angeführten Weise eine Nutroselösung zu erhalten, der Zusatz einer nicht ganz unerheblichen Menge n-NaOH nötig, andererseits ist die Herstellung der Kaseinlösung aus Kasein + NaOH weniger zeitraubend als die aus Nutrose, besonders wenn man das vorzüglich reine Kaseinpräparat der Fabrik Rhenania-Aachen verwendet.

Soll die Natriumkaseinlösung der Pepsinbestimmung dienen, so werden zu der einzelnen Probe von 100 ccm Stammlösung 11 ccm n-HCl zugesetzt.

Man bringt am besten die Säure zuerst in das Verdauungsgefäß, verdünnt mit etwa 150 bis 180 Wasser und läßt dann die Kaseinlösung einlaufen. Anderenfalls muß man die Kaseinlösung mit Wasser verdünnen und auf 40° erwärmen, dann erhält man auch bei nachträglichem Zusatz der 11 ccm HCl schnell eine klare Lösung.

Als Digestionsgefäß verwendet Volhard langhalsige Flaschen, welche mit 2 Marken von 300 und 400 ccm versehen sind.*) Im einzelnen gestaltet sich demnach ein Versuch folgendermaßen:

Man mißt aus einer Bürette genau 11 ccm n-HCl in die Pepsinflasche, füllt mit aq. dest. auf etwa 150 ccm auf und gibt dann unter Schütteln 100 ccm der beschriebenen Na-Kaseinlösung aus einer durch ⊢ Rohr mit der Vorratsflasche verbundenen, umgekehrt eingespannten 100 ccm Pipette zu, wobei keine Kaseinausscheidung bleiben darf. Dann wird eine beliebige, aber genau zu bestimmende Menge des zu untersuchenden Magensaftes mit einer Pipette zugefügt, am besten nachdem die Mischung vorher schon im Wasserbad von 40° erwärmt wurde, und mit aq. dest. bis zu Marke 300 aufgefüllt. Nun wird die Mischung beliebige aber genau zu bestimmende Zeit hindurch — z. B. 1 Stunde lang — der Digestion im Wasserbad von 40° ausgesetzt. Um die Verdauung zu unterbrechen, genügt der Zusatz von 100 ccm 20proz. Na_2SO_4-Lösung bis zur Marke 400, welche, wie oben bereits besprochen, die Pepsinwirkung sofort unterbricht und das bis dahin unverändert gebliebene Kasein in Flocken ausfällt, während die unter der Pepsinwirkung entstandenen salzsauren Peptone bei der nun folgenden Filtration ins Filtrat mit übergehen.

Alsdann wird die Acidität von 100 oder 200 ccm des Filtrates durch Titration mit $\frac{n}{10}$-NaOH bestimmt. Von der Gesamtacidität des Filtrates wird die ein für alle Mal bestimmte, auf ihre Konstanz von Zeit zu Zeit zu prüfende Acidität der Stammlösung subtrahiert, um den auf die Bildung salzsaurer Peptone zurückzuführenden Säurezuwachs des Filtrates zu finden. Davon ist natürlich der Säurewert des zugesetzten Magensaftes noch abzuziehen.

Als Indikatoren für die Aciditätsbestimmung wurden Nitrophenol, Alizarin und Phenolphthalein angewandt. Es ergab sich, daß mit Phenolphthalein die schärfsten Umschläge erzielt werden. Auf einzelnes wird bei einer der folgenden Tabellen aufmerksam zu machen sein.

Die Resultate der mit der Volhardschen Methode ausgeführten Pepsinbestimmungen bestätigen, daß das Verfahren bei nicht zu hochgradiger Fermentwirkung — wie sie durch zu groß

---

*) Geliefert von Wallach Nachf. in Kassel.

gewählte Magensaftmenge oder zu lange Zeit der Verdauung bedingt sein können — dem Gesetz von Schütz und Huppert entsprechende Werte liefert, d. h. es verhalten sich die Aciditätszunahmen der Filtrate bei Zusatz verschiedener Mengen desselben Magensaftes unter gleichen Versuchsbedingungen wie die Quadratwurzeln aus den relativen Fermentmengen und den Verdauungszeiten: $A : A_1 = \sqrt{f \cdot t} : \sqrt{f_1 \cdot t_1}$, wobei A den Aciditätszuwachs, f die relative Fermentmenge, t die Verdauungszeit bedeutet.

Zur Illustration dieses Verhaltens mögen die folgenden Tabellen dienen. Bei allen diesen Tabellen ist übrigens mehr oder weniger die stets beobachtete Erscheinung zu bemerken, daß der Aciditätszuwachs im ersten Stadium der Verdauung, wenn also das Produkt $f \times t$ noch klein ist, ein relativ geringerer ist als bei größerem Wert des Produktes $f \times t$.

Tabelle I.

Titration : 150 ccm / Indikator	Stammlösung	Aciditätszuwachs	Acidität nach Einwirkung von 1 ccm Mgs.	Aciditätszuwachs	Acid. bei 4 ccm Mgs.	Aciditätszuwachs	9 ccm Mgs.
Nitrophenol							
erster Umschlag	15,9	**4,1**	20	**8,3**	24,2	**14,0**	29,9
maximaler „	17,1	6,0	23,1	10,9	28,0	18,3	35,4
$\frac{v}{\sqrt{f \cdot t}} =$		**4,1**		**4,15**		**4,7**	

Tabelle II.

Titration : 100 ccm / Indikator	A Stammlösung	Aciditätszuwachs B−A	B 1 ccm Magensaft 1 Stde. [f × t = 1]	Aciditätszuwachs C−B	C 4 ccm Magensaft 1 Stde. [f × t = 4]	Aciditätszuwachs D−C	D 9 ccm Magensaft 1 Stde. [f × t = 9]	Aciditätszuwachs E—D	E 4 ccm Magensaft 4 Stdn. [f × t = 16]
Nitrophenol									
Spuren	11.5	0,4	11,9	0,6	12.5	0,6	13,1	0,6	13,7
deutlich gelb . . .	11,7	0,5	12,2	0,7	12,9	0,6	13,5	0,8	14,3
maximaler Umschlag	12,3	0,5	12,8	1,1	13,9	1,0	14,9	1,1	16,0
Alizarin	11,8	0,5	12,3	0,7	13,0	0,6	13,6	0,8	14,4
Phenolphtalein									
Spuren	12,5	**0,6**	13,1	**1,3**	14,4	**1,3**	15,7	**1,3**	17,0
rosa	12,7	0,6	13,3	1,4	14,7	1,3	16,0	1,4	17,4
maximaler Umschlag	13,9	0,9	14,8	1,5	16,3	1,4	17,7	1,5	19,2

Tabelle III.

Versuchsanordnung: Magensaft mit $CaCO_3$ neutralisiert. (Alkalibindungsvermögen der Peptone nicht abgezogen.) Titration je 100 ccm / Indikatoren	A Acidität der Stammlösung	Aciditätszuwachs B—A	B 1 ccm Magensaft 1 Stde.	Aciditätszuwachs C—B	C 4 ccm Magensaft 1 Stde.	Aciditätszuwachs D—C	D 9 ccm Magensaft 1 Stde.
Nitrophenol							
Spuren	11,5	0,3	11,8	0,6	12,4	0,4	12,8
deutlich gelb	11,7	0,4	12,1	0,7	12,8	0,6	13,4
maximaler Umschlag .	12,3	0,7	13,0	0,9	13,9	0,8	14,7
Phenolphthalein							
Spuren	12,5	**0,7**	13,2	**1,3**	14,5	**1,4**	15,9
rosa	12,7	0,7	13,4	1,3	14,7	1,5	16,2
maximaler Umschlag .	13,9	0,8	14,7	1,6	16,3	1,7	18,0

Es sind in diesen 3 Tabellen je 3 Versuche mit demselben Magensaft unter gleichen Versuchsbedingungen und bei gleicher Verdauungszeit ausgeführt, bei denen sich die zugesetzten Magensaftmengen verhalten wie 1 : 4 : 9, die Aciditätszunahmen gegenüber der vorangestellten Stammlösung aber annähernd wie die Quadratwurzeln der Fermentmengen also wie 1 : 2 : 3. Die geringen Abweichungen liegen im Bereich der Fehlergrenzen.

Die nun folgenden Tabellen IV und V dienen zur Erläuterung des Zeitgesetzes: Die zugesetzten Magensaftmengen sind innerhalb des einzelnen Versuches die gleichen, die Dauer der Einwirkung beträgt 1, 4, 9 Stunden, die Säurezunahme erfolgt abgesehen von den zu kleinen Werten bei zu kurzer Verdauungszeit nach dem Verhältnis 1 : 2 : 3.

Tabelle IV.

Versuchsanordnung wie oben / Indikatoren	A Acidität der Stammlösung	Aciditätszuwachs B—A	B 4 ccm Magensaft 1 Stunde	Aciditätszuwachs C—A	C 4 ccm Magensaft 4 Stdn.
Nitrophenol					
Spuren	11,5	1,0	12,5	2,2	13,7
deutlich gelb . . .	11,7	1,2	12,9	2,6	14,3
maximaler Umschlag	12,3	1,6	13,9	3,7	16,0
Alizarin	11,8	**1,2**	13,0	**2,6**	14,4

Tabelle V.

Versuchsanordnung wie oben / Indikatoren	A Acidität der Stammlösung	Aciditätszuwachs B—A	B 1 ccm Magensaft 1 Stde.	Aciditätszuwachs C—B	C 1 ccm Magensaft 4 Stdn.	Aciditätszuwachs D—C	D 1 ccm Magensaft 9 Stdn.
Nitrophenol							
Spuren	11,5	0,3	11,8	0,5	12,3	0,6	12,9
deutlich gelb	11,7	0,4	12,1	0,6	12,7	0,5	13,2
maximaler Umschlag . .	12,3	0,7	13,0	0,7	13,7	0,9	14,6
Phenolphthalein							
Spuren	12,5	0,7	13,2	1,1	14,3	1,3	15,6
rosa	12,7	0,7	13,4	1,1	14,5	1,4	15,9
maximaler Umschlag .	13,9	0,8	14,7	1,5	16,2	1,7	17,9

In den beiden folgenden Tabellen wurden wie in den oben mitgeteilten Versuchen Volhards beide Faktoren f und t variiert. Wenn das Gesetz zutrifft, so müssen die Quotienten aus der Aciditätszunahme dividiert durch $\sqrt{f.t}$ konstant sein. Das ist von einem gewissen Grade der Fermentwirkung ab in der Tat der Fall.

Tabelle VI.

Versuchsanordnung wie oben	Acidität der Stammlösung	1 ccm Magensaft			2 ccm Magensaft			3 ccm Magensaft		
		1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.	1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.	1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.
Phenolphthalein .	8,3	11,2	11,7	12,3	13,0	13,8	15,3	13,7	15,7	17,2
Aciditätszuwachs .		2,9	3,4	4,0	4,7	5,5	7,0	5,4	7,4	8,9
Nach dem Zeitfermentgesetz zu erwartender Zuwachs		2,9	4,1	5,0	4,1	5,8	7,1	5,0	7,1	8,7
Konstante [berechnet nach $K=\frac{v}{\sqrt{f.t}}$]		2,9	2,4	2,3	3,3	2,8	2,9	3,1	3,0	3,0

Mittelwert für $\frac{v}{\sqrt{ft}} = 3{,}03$

Tabelle VII.

Titriert: 200 cm; Magensaft mit $CaCO_3$ neutralisiert	Acidität der Stammlösung	1 ccm Magensaft			2 ccm Magensaft			3 ccm Magensaft		
		1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.	1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.	1 Stde.	2 Stdn.	3 Stdn.
Phenolphthalein .	17,1	21,8	23,5	25,2	25,3	28,8	31,3	27,4	31,2	35,6
Aciditätszuwachs .		4,7	6,4	8,1	8,2	11,7	14,2	10,3	14,1	18,5
Nach dem Zeitfermentgesetz zu erwartender Zuwachs		5,9	8,2	10,2	8,2	11,9	14,5	10,2	14,5	17,9
Konstante [berechnet nach $K=\frac{v}{\sqrt{f.t}}$]		4,7	$4{,}5_4$	4,7	5,7	5,8	5,8	$5{,}9_5$	$5{,}7_6$	6,2

Dem Gesagten entspricht auch, daß man die gleichen Aciditätszunahmen findet, wenn man in verschiedenen Versuchen das Produkt f × t stets gleich groß wählt. Z. B. beträgt der Aciditätszuwachs in Tabelle VI für 2 ccm in 3 Stdn. 7,0, für 3 ccm in 2 Stdn. 7,4; in Tabelle VII für 2 ccm in 3 Stdn. 14,2, für 3 ccm in 2 Stdn. 14,1. Man kann dies auch aus den beiden folgenden Tabellen ersehen:

Tabelle VIII.

Versuchsanordnung wie in Tab. VII / Indikator	Stammlösung	Aciditätszuwachs bei Versuch I	I. 1 ccm Magensaft 8 Stdn.	Aciditätszuwachs bei Versuch II	II. 2 ccm Magensaft 4 Stdn.	Aciditätszuwachs bei Versuch III	III. 4 ccm Magensaft 2 Stdn.
Nitrophenolumschlag . .	24,0	**18,8**	42,8	**19,2**	44,2	**19,4**	44,4
Phenolphthalein Spuren . . .	24,2	**24,2**	48,4	**24,0**	48,2	**24,9**	49,1
Phenolphthalein Maximal . . .	25,0	**25,2**	50,2	**24,7**	49,7	**25,5**	50,5

In Tabelle VIII ist das Produkt f × t stets gleich 8, die Aciditätszunahme ist in allen 3 Versuchen nahezu die gleiche.

Tabelle IX zeigt das gleiche Verhalten mit noch größerer Übereinstimmung der Aciditätszunahmen. Das Produkt f × t ist in allen 3 Versuchen = 9 und setzt sich nur aus verschieden großen Faktoren zusammen, nämlich aus $^1/_2 . 18$, $2 . 4^1/_2$, $4^1/_2 . 2$.

Tabelle IX.

Versuchsanordnung wie oben. Titriert: 100 ccm / Indikator	Stammlösung	Aciditätszuwachs bei Versuch I	I. 0,5 ccm Magensaft 18 Stdn.	Aciditätszuwachs bei Versuch II	II. 2,0 ccm Magensaft $4^1/_2$ Std.	Aciditätszuwachs bei Versuch III	III. 4,5 ccm Magensaft 2 Stdn.
Nitrophenol							
Spuren	10,5	5,3	15,8	5,7	16,2	5,7	16,2
deutlicher Umschlag .	11,0	5,6	16,6	5,9	16,9	5,8	16,8
Maximalfärbung . . .	11,5	7,6	19,1	7,7	19,2	8,0	19,5
Phenolphthalein							
Spuren	11,6	**11,3**	22,9	**11,3**	22,9	**11,4**	23,0
rosa	11,8	11,6	23,4	11,6	23,4	11,8	23,6
Maximalfärbung . . .	12,7	13 6	26,3	13,8	26,4	13 5	26,2

Dasselbe Verhalten zeigen die Tabellen X und XI.

Tabelle X.

Versuchsanordnung wie oben. Titriert: 100 ccm / Indikator	f × t = 9	
	a) 1 ccm Magensaft 9 Stdn.	b) 9 ccm Magensaft 1 Stde.
Nitrophenol		
Spuren	12,9	12,8
deutlich gelb	13,2	13,4
maximaler Umschlag . .	14,6	14,7
Phenolphthalein		
Spuren	**15,6**	**15,9**
rosa	15,9	16,2
maximaler Umschlag . .	17,9	18,0

Tabelle XI.

Versuchsanordnung wie oben. Titriert: 100 ccm / Indikator	f × t = 4		
	a) 1 ccm Magensaft 4 Stdn.	b) 4 ccm Magensaft 1 Stde.	c) 2 ccm Magensaft 2 Stdn.
Nitrophenol			
Spuren	12,3	12,4	12,4
deutlich gelb . .	12,7	12,8	12,7
maximal. Umschl.	13,7	14,0	13,9
Phenolphthalein			
Spuren	**14,3**	**14,5**	**14,5**
rosa	14,5	14,7	14,7
maximal. Umschl.	16,2	16,3	16,3

Sehr instruktiv ist die folgende Versuchsreihe XII, in welcher 1, 4 und 9 ccm eines ziemlich normal aciden Magensaftes 1, 4 und 9 Stunden lang zur Verdauung der Kaseinlösung benutzt wurden.

Vergleichen wir die durch 1 ccm Magensaft in 1, 4, 9 Stunden bedingte Aciditätszunahme, so sehen wir auch hier wieder die Übereinstimmung mit dem Zeitgesetz: wir müssen nach diesem erwarten die Werte 3,7 : 7,4 : 11,1 und finden 4,0 : 7,2 : 11,0. Auch die Bestätigung des Fermentgesetzes finden wir bei den Versuchen, welche 1 Stunde lang der Digestion ausgesetzt waren. Der Aciditätszuwachs beträgt in 1 Stunde bei 1, 4, 9 ccm Magensaft: 4,0 : 9,5 : 12,0. Dagegen ist in den höheren Abschnitten dieser Versuchsreihe das Zeit- und Fermentgesetz nicht mehr gültig, ja wir finden, nachdem schon der Versuch: 4 ccm : 4 Stunden eine abnorm geringe Zunahme des Säurewertes aufweist, von da ab,

Tabelle XII.

Titriert: 100 ccm / Indikatoren	Stammlösung	t = 1 Stunde: Acid.-Zuwachs	t = 1 Stunde: 1 ccm Magensaft	t = 1 Stunde: Acid.-Zuwachs	t = 1 Stunde: 4 ccm Magensaft	t = 1 Stunde: Acid.-Zuwachs	t = 1 Stunde: 9 ccm Magensaft	t = 4 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 4 Stunden: 1 ccm Magensaft	t = 4 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 4 Stunden: 4 ccm Magensaft	t = 4 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 4 Stunden: 9 ccm Magensaft	t = 9 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 9 Stunden: 1 ccm Magensaft	t = 9 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 9 Stunden: 4 ccm Magensaft	t = 9 Stunden: Acid.-Zuwachs	t = 9 Stunden: 9 ccm Magensaft
Nitrophenol																			
Spuren	10,5	2,0	12,5	4,8	15,3	6,0	16,5	3,9	14,4	7,5	18,0	7,6	18,1	5,8	16,3	7,4	17,9	6,8	17,3
deutlicher Umschl.	11,0	1,9	12,9	5,5	16,5	7,3	18,3	3,9	14,9	7,5	18,5	7,9	18,9	6,0	17,0	7,6	18,6	7,0	18,0
maximaler „	11,5	2,8	14,3	7,0	18,5	9,4	20,9	5,1	16,6	9,3	20,8	11,6	23,1	7,3	18,8	9,3	20,8	9,4	20,9
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phenolphthalein																			
I. Spuren	11,6	**4,0**	15,6	**9,5**	21,1	**12,0**	23,6	**7,2**	18,8	12,6	24,2	13,7	25,3	**11,0**	22,6	13,7	25,3	13,9	25,5
Konstante [berechnet nach $K = \frac{v}{\sqrt{f \cdot t}}$]		**4,0**		**$4{,}7_5$**		**4,0**		**3,6**		$3{,}1_5$		2,3		**3,7**		2,3		$1{,}5_4$	
II. rosafarbig . .	11,8	4,2	16,0	9,7	21,5	12,5	24,3	7,5	19,3	12,9	24,7	14,2	26,0	10,4	23,2	13,9	25,7	14,6	26,4
III. maximale Rotf.	12,7	4,8	17,5	11,0	23,7	14,4	27,1	8,8	21,5	15,3	28,0	16,7	29,4	12,9	25,6	16,5	29,2	17,1	29,8
Alizarin	11,4	1,8	13,2	5,5	16,9	7,5	18,9	4	15,4	7,4	18,8	8,9	20,3		17,7		19,0		19,5
Abstand zwischen Alizarin und Phenolphthalein I . . .			2,4		4,2		4,7		3,4		5,4		5,0		4,9		6,3		6,0

d. h. nachdem das Produkt f×t für diese Versuchsreihe den Wert 16 überschritten hat, kein Wachsen der Säurewerte mehr, wenn wir von dem länger anhaltenden, geringen Ansteigen der Phenolphthaleinwerte absehen.

Schon makroskopisch war übrigens in den Versuchen mit großem Produkt f×t Plasteinbildung zu erkennen, ein Zeichen, daß die Verdauung ihrem Ende entgegenging. Es zeigt sich also, daß 4 ccm dieses Magensaftes in 4 Stunden schon den gleichen Aciditätszuwachs bedingen, wie nach 9 Stunden, dagegen ist innerhalb der 4-Stundenversuche derjenige mit 9 ccm Magensaft gegenüber dem mit 4 ccm doch noch durch eine deutlich höhere Aciditätszunahme ausgezeichnet.

Daraus würde also zu schließen sein, daß, wenn man das Produkt f×t groß wählt, der Faktor f einen länger dauernden Einfluß auf das Anwachsen der Säurewerte haben wird, als der Faktor t.

Die letzte Reihe der Tabelle XII, in welcher der jeweilige Abstand des 1. Phenolphthaleinumschlages vom Alizarinumschlag vermerkt ist, zeigt ebenfalls im 1-Stundenversuch ein Anwachsen dieser Differenz; ebenso ist dasselbe deutlich vorhanden innerhalb der drei Versuche mit 1 ccm Magensaft, während bei Vergleich der drei 4-Stundenversuche unter sich, wie auch der 9-Stundenversuche unter sich, sich ergibt, daß die Steigerung der Fermentmenge von 4 auf 9 keine Vermehrung der Differenz mehr bedingt. Damit kommt zum Ausdruck, daß bei dieser Höhe des Produktes f×t im gegebenen Versuch die Verdauung abgeschlossen ist. Denn wir können, worauf Volhard aufmerksam gemacht hat, das Anwachsen der Differenz zwischen Alizarin- und Phenolphthaleinumschlag, wie wir es auch in den tieferen Stufen der vorliegenden Tabelle sehen, als Ausdruck der wachsenden Peptonisierung betrachten. Der Phenolphthaleinumschlag tritt um so später auf, je mehr alkalibindende Peptone unter der Verdauung gebildet sind.

Es läßt sich übrigens auch leicht berechnen, daß bei einer Acidität von 19 ccm für Alizarin auf 100 Filtrat die Verdauung abgeschlossen d. h. alle Salzsäure ins Filtrat übergegangen ist.

Im ganzen Verdauungsgemisch würden dann $4 \times 19 = 76$ $\frac{n}{10}$-Säure sein, und zugesetzt wurden bei Bereitung der Stammlösung zu 100 Kasein 4 n-NaOH + 11 n-HCl = 70 $\frac{n}{10}$-HCl.

Um Aciditätszunahmen zu erhalten, die unter das Fermentgesetz fallen, wird man also zu kleine und zu große Werte durch geeignete Versuchsanordnung vermeiden müssen. Unter Einhaltung dieser Bedingungen ermöglicht die Volhardsche Methode,

von den größten bis zu den kleinsten Fermentmengen einen quantitativen Nachweis zu liefern. Denn es sind hemmende Faktoren, wie sie die ursprüngliche Mettsche Methode ungeeignet machten, durch die große Verdünnung ausgeschaltet, andererseits ist die Möglichkeit gegeben, bei fermentarmen Säften die Menge des zugesetzten Magensaftes bis zu etwa 20 ccm zu erhöhen, (wobei immer noch eine Verdünnung von 1 : 14 bestünde), oder die Verdauungszeit zu verlängern.

Durch Vermehrung der Saftmenge läßt sich beim Volhardschen Verfahren die Wirkung erhöhen und auch bei geringem Pepsingehalt des Saftes deutlich machen, während bei dem Mettschen Verfahren die Menge des angewandten Saftes ohne Einfluß auf den Verdauungswert bleibt, weil bei ihr die relative Pepsinkonzentration das entscheidende ist, nicht wie bei unserer Methode die absolute Pepsinmenge.

Daß die Methode außerdem den Vorzug großer Einfachheit gegenüber den meisten anderen Formen der Pepsinbestimmung hat, da sie bei bekannter Acidität der Stammlösung nur eine einfache Titration des Filtrates vom Verdauungsgemisch erfordert, wurde schon oben betont.

Für die praktische Anwendung der Volhardschen Methode und eine einheitliche Bezeichnung der durch den Versuch ermittelten Pepsinkonzentration empfiehlt sich eine ganz analoge Ausdrucksweise, wie sie Volhard bei den fettspaltenden Fermenten durchgeführt hat. Volhard bezeichnet als Pepsineinheit diejenige Fermentmenge, welche das Filtrat der ganzen angewandten Kaseinmenge um 1 ccm $\frac{n}{10}$ saurer machen würde.

Durch den Versuch erhalten wir in dem Quotienten aus dem Aciditätszuwachs, dividiert durch das Produkt t . f (Verdauungszeit und Anzahl der angewandten ccm Saft), den Verdauungswert, den 1 ccm Saft in 1 Stunde liefern würde. Dieser Wert ist mit 2 oder 4 zu multiplizieren, je nachdem 200 oder 100 ccm Filtrat titriert wurden. Der so erhaltene Wert der Aciditätszunahme für das Filtrat des gesamten Verdauungsgemisches (400) unterliegt natürlich auch dem Fermentgesetz und ist auf das Quadrat zu erheben, um die Konzentration des Saftes an Pepsineinheiten auszudrücken. Für die Pepsineinheit x gilt die Formel

$$\frac{v}{\sqrt{x.f.t}} = 1, \; x = \frac{v^2}{f.t.}$$

Beispiel: Die Acidität von 200 ccm der Stammlösung nach Fällung und Filtration sei = 18,0, in 400 = 36,0. Die Acidität des Saftes sei = 20 ccm

in 100 Saft. Im Versuch wird bei Digestion von 100 Kaseinlösung auf 300 mit 3 ccm Saft in 3 Stunden nach Auffüllung mit Na_2SO_4 auf 400 und Filtration in 200 ccm Filtrat eine Acidität von 32,7, in 400 = 65,4 ermittelt. Davon sind abzuziehen für die Stammlösung = 36,0

Saftacid. = 0,6

v = 28,8

$$\sqrt{x} = \frac{28{,}8}{3 \cdot 3} = 3{,}2.$$

x = 10,24 Pepsineinheiten.

II.

Hinter der Bedeutung einer einfachen und doch zuverlässigen Methode der quantitativen Pepsinbestimmung stand bis heute — namentlich was das klinische Interesse anbetrifft — diejenige eines Nachweises tryptischer Wirkung weit zurück. Dementsprechend ist auf dem Gebiete der Pankreatinbestimmung nicht entfernt soviel gearbeitet worden wie auf dem des Pepsinnachweises.

Thomas und Weber geben in ihrer schon oben mehrfach erwähnten Arbeit eine knappe Übersicht über die bis dahin gebräuchlichen Methoden der Trypsinbestimmung, der ich mich im folgenden im wesentlichen anschließe.

Ein Verfahren, welches in den Pharmakopoeen Großbritanniens und der Vereinigten Staaten empfohlen wird, beruht auf der Einwirkung einer bestimmten Menge wässerigen Extraktes der zu untersuchenden Pankreaspräparate auf frische Milch. Nach $^1/_2$ bis 1 Stunde wird durch Zusatz von Salpetersäure der etwaige Gehalt an unverändertem Eiweiß erprobt, und zwar soll bei guten Präparaten nach dieser Zeit bei bestimmter Versuchsanordnung keine Gerinnung mehr durch den Salpetersäurezusatz bewirkt werden.

Ein anderes sehr einfaches aber auch sehr wenig zuverlässiges Verfahren begnügt sich damit, die Zeit zu bestimmen, welche eine bestimmte Menge des zu untersuchenden Präparates braucht, um Fibrinflocken von annähernd bestimmter Größe vollständig aufzulösen.

Fermis Methode basiert auf der Verflüssigung desinfizierter Gelatine, ebenso das von Linossier angegebene Verfahren, bei dem nach bestimmter Verdauungszeit die Einwirkung des Trypsins auf eine in einer Kapillarröhre erstarrte Gelatinesäule unterbrochen und unter dem Mikroskop die Länge des verdauten Gelatinefadens gemessen wird, also ein Verfahren, das an die Mettsche Pepsinbestimmung erinnert.

Auch die für die Pepsinbestimmung vielfach verwandte Methode, bei welcher die Einwirkung auf hartgekochtes Hühnereiweiß den Maßstab für die Beurteilung des Fermentgehaltes abgibt, ist in entsprechender Modifikation auf die tryptische Wirkung angewandt worden.

Thomas und Weber haben das gewichtsanalytische Verfahren angegeben, dem ihre Pepsinbestimmungsmethode nachgebildet ist. Nach ihrer neuen Modifikation verwenden sie, wie oben schon erwähnt, die

gleiche Kaseinlösung als Stammlösung wie für die Pepsinbestimmung, nur daß bei dieser letzteren die Hinzufügung von 11 ccm n-HCl vor jedem Versuch notwendig ist, während für die Trypsinwirkung gerade die schwachalkalische Reaktion der Kaseinlösung zweckentsprechend ist, der HCl-Zusatz also erst nach Abschluß der Verdauung erfolgt, um die Fällung mit Na_2SO_4 zu ermöglichen. Sie verfahren des weiteren ganz analog, wie oben für ihre Pepsinbestimmung angegeben wurde.

Mit der von Thomas und Weber in ihrer neuen Modifikation erprobten Möglichkeit, die alkalische Kaseinlösung in die saure überzuführen, war auch zugleich die Möglichkeit gegeben, die gewichtsanalytische Trypsinbestimmung ebenso wie die Pepsinbestimmung titrimetrisch umzugestalten.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß von der für die Pepsinbestimmung vorrätigen oben beschriebenen Kaseinlösung 100 ccm in die mit Marken für 300 und 400 ccm versehenen Flaschen abgemessen wurde. Sodann wurde das zu untersuchende Präparat — wir verwandten Pankreatin (Rhenania), das sich allerdings trotz geringen Zusatzes von $\frac{n}{10}$-NaOH nicht als völlig löslich erwies, dessen Filtrat jedoch, wie die Versuche zeigten, sehr stark Eiweiß spaltete — zugegeben und mit aq dest. auf 300,0 aufgefüllt. Diese Mischung blieb dann eine genau zu bestimmende Zeit im Wasserbad von 40°.

Analog dem Pepsinverfahren wird dann durch nachträglichen Zusatz von 11 ccm n-HCl und 100 ccm 20proz. Na_2SO_4 die Verdauung unterbrochen und das unverdaute Kasein ausgefällt. Die salzsauren Peptone gehen durchs Filter, und der durch sie bedingte Säurezuwachs dient als Maß für den Grad der Fermentwirkung.

Die Verwendbarkeit der Volhardschen Methode zum qualitativen Trypsinnachweis wurde zunächst durch einen Versuch erwiesen, bei dem 10 ccm von dem Inhalt einer Pankreascyste verwandt wurden. Der Versuch fiel positiv aus.

Schon der qualitative Nachweis ist für gewisse theoretische und für manche praktische Fragen von Interesse, und insofern bedeutet es eine große Annehmlichkeit, mit derselben Stammlösung ein Versuchsobjekt sowohl auf Pepsin- als auf Trypsingehalt untersuchen zu können, indem nur im einen Fall die Salzsäure der Mischung vor dem Versuch, im anderen nach der Digestion zugefügt wird.

Es wurden von mir nun eine Reihe von Magensäften in dieser einfachen Weise untersucht. Ich lasse zunächst drei Tabellen normaler Magensäfte folgen, aus denen hervorgeht, daß im Magen normaler Weise kein Pankreassaft vorkommt; denn die alkalisch angesetzten Versuche zeigten keine Abweichungen ihrer Säurewerte von dem der Stammlösung, während in saurer Lösung ein nicht unbedeutender Säurezuwachs durch Pepsinwirkung bedingt wurde. (NB. Die Magensäfte wurden vor dem Versuche mit $CaCO_3$ neutralisiert.)

Tabelle XIII.

Titriert: 150 ccm / Indikator	Stamm-lösung	3 ccm Magensaft in alk. Lösung 2 Stdn. diger.	3 ccm Magensaft in saurer Lösung 2 Stdn. diger.
Nitrophenol			
Spuren	15,9	15,8	25,0
deutlich. Umschlag . .	16,4	16,1	27,0
maximaler Umschlag .	17,1	17,1	28,7
Phenolphthalein			
Spuren	**17,4**	**17,4**	**33,0**
rosa	17,6	17,6	33,5
maximale Rotfärbung .	19,6	18,5	36,8

Tabelle XIV.

Titriert: 100 ccm / Indikator	Stamm-lösung	1 ccm Magensaft in alkal. Lösung 1 Stde. diger.	1 ccm Magensaft in saurer Lösung 1 Stde. diger.
Nitrophenol			
Spuren	10,6	10,7	11,2
deutlich. Umschlag . .	10,9	10,9	11,7
maximaler Umschlag .	11,3	11,5	12,3
Phenolphthalein			
Spuren	**11,6**	**11,6**	**13,1**
rosa	11,7	11,7	13,4
maximale Rotfärbung .	13,1	13,0	15,5

Tabelle XV.

Titriert: 100 ccm / Indikator	Stamm-lösung	2 ccm Magensaft in alkal. Lösung 1 Stde. diger.	2 ccm Magensaft in saurer Lösung 1 Stde. diger.
Nitrophenol			
Spuren	10,6	10,6	12,2
deutlich. Umschlag . .	10,9	10,8	12,6
maximaler Umschlag .	11,3	11,2	13,8
Phenolphthalein			
Spuren	**11,6**	**11,5**	**15,2**
rosa	11,7	11,8	15,5
maximale Rotfärbung .	13,1	12,9	17,4

Tabelle XVI.

Titriert: 100 ccm / Indikator	Stammlösung	2 ccm Magensaft in alkal. Lösung 1 Stde. diger.	2 ccm Magensaft in saurer Lösung 1 Stde. diger.
Nitrophenol			
Spuren	10,6	10,5	13,0
deutlich. Umschlag . .	10,9	10,7	13,8
maximaler Umschlag .	11,3	11,2	15,9
Phenolphthalein			
Spuren	11,6	11,5	17,1
rosa	11,7	11,7	17,4
maximale Rotfärbung .	13,1	12,9	19,8

Im Anschluß an diese Versuche sei der Befund eines Falles von gutartiger Achylie erwähnt. Auch in diesem Falle wurde der Einfluß des Magensaftes auf saure und alkalische Kaseinlösung bestimmt, und es fand sich auch hier, wie Tabelle XVII zeigt, ein Ausbleiben der Aciditätsvermehrung im alkalischen Versuch. Dieser Fall der Tabelle XVII wurde besonders interessant dadurch, daß sowohl bei Zusatz von Probefrühstückfiltrat als auch bei Zusatz einiger ccm des Filterrückstandes eine Trypsinwirkung nicht eintrat, während gleichzeitig von Zinßer angestellte Versuche nachweisen konnten, daß der Filterrückstand deutlich fettspaltende Wirkung hatte. Es spricht dies gegen die Behauptung, daß die von Volhard dem Magensafte zugeschriebene fettspaltende Wirkung auf einen Rückfluß fettspaltenden Pankreasfermentes in den Magen zu beziehen sei. Diese Erklärung als richtig angenommen, müßte sich doch in dem beschriebenen Falle neben der Fettspaltung auch tryptische Eiweißspaltung nachweisen lassen, was aber wie gesagt, nicht der Fall ist.

Tabelle XVII.

Titriert: 150 ccm / Indikator	3 ccm Magensaft von Achylie in alkal. Lösung 1 Stde. diger.	Stammlösung
Nitrophenol		
Spuren	15,7	15,8
deutlich. Umschlag. .	16,0	16,1
maximaler Umschlag .	16,8	17,0
Phenolphthalein		
Spuren	17,0	17,1
rosa	17,4	17,3
maximale Rotfärbung .	19,3	19,5

Der einzige Fall, in welchem die Untersuchung des neutralisierten Magensaftes schon in alkalischer Lösung ein positives Resultat hatte, während sogar die Pepsinwirkung nur recht gering war, ist der eines Mannes mit Achylie infolge von mehrere Jahre zurückliegender Säurevergiftung, bei dem entsprechend einem fast völligen Mangel der Salzsäure auch die Pepsinmengen sehr herabgesetzt sind. Die starke Trypsinwirkung seines Magensaftes erklärt sich daraus, daß seinerzeit bei ihm die Gastroenterostomie gemacht worden ist, sodaß in diesem Falle allerdings ein Rückfluß zum Magen in gewissem Grade als Normalzustand angenommen werden kann. Die folgende Tabelle wird das Verhältnis von peptischer und tryptischer Eiweißspaltung in diesem Falle erläutern:

Tabelle XVIII.

Titriert: 150 ccm / Indikator	Stammlösung	1-Stundenversuch		8-Stundenversuch	
		in saurer Lösung	in alkal. Lösung	in saurer Lösung	in alkal. Lösung
Nitrophenol					
Spuren	17,0	17,7	18,6	19,5	27,9
deutlich Spuren	17,4	18,2	19,3	20,7	31,0
maximaler Umschlag . .	17,6	19,0	20,3	22,9	35,6
Phenolphthalein					
Spuren	**17,7**	**19,2**	**20,4**	**24,7**	**41,4**
Aciditätszuwachs	—	1,5	2,7	7,0	23,7
Konstante		$\frac{v}{\sqrt{t}}$ 1,5	$\frac{v}{t}$ 2,7	$\frac{v}{\sqrt{t}}$ 3,0	$\frac{v}{t}$ 2,96

Wir haben auch Versuchsreihen angestellt darüber, ob das Trypsin der Schützschen Regel folgt.

Pawlow hat angegeben, daß die Verdauung mit Trypsin proportional den Quadratwurzeln aus den Fermentmengen fortschreitet. Unsere Versuche machen es aber nicht wahrscheinlich, daß die tryptische Wirkung nach der Formel $K = \frac{v}{\sqrt{t \cdot f}}$ geht, vielmehr sprechen die in den folgenden Tabellen enthaltenen Werte mit teilweiser schlagender Genauigkeit für die Annahme, daß die eiweißspaltende Wirkung des Trypsins sich direkt proportional dem Produkt aus Fermentmenge $\times$ Verdauungszeit verhält. Tabelle XIX

Tabelle XIX.

t = 1 Stunde Titriert: 100 ccm Indikator	Stamm-lösung	1. Acid.-Zuwachs	I. 1 ccm Pankr.	A. 2. Acid.-Zuwachs	II. 4 ccm Pankr.	B. 3. Acid.-Zuwachs	III. 9 ccm Pankr.
Nitrophenol							
Spuren	11,1	0,5	11,6	1,9	13,0	4,3	15,4
deutlich. Umschlag . .	11,3	0,5	11,8	2,2	13,5	4,6	15,9
maximaler Umschlag .	11,6	0,8	12,4	3,0	14,6	6,8	18,4
Phenolphthalein							
Spuren	11,8	**0,9**	12,7	**3,7**	15,5	**8,2**	20,0
rosa	12,2	0,8	13,0	3,7	15,9	7,3	20,5
maximale Rotfärbung .	13,1	1,3	14,4	4,9	18,0	10,3	23,4
Konstante berechnet							
$K = \frac{v}{f.t}$		**0,9**		**0,9**		**0,9**	

zeigt einen Versuch, bei dem Pankreatinmengen im Verhältnis 1 : 4 : 9 nebeneinander je 1 Stunde lang zur Verdauung verwandt wurden. Dabei ergibt sich, daß die gefundenen Werte für den Säurezuwachs sich nicht wie 1 : 2 : 3, sondern wie 1 : 4 : 9 verhalten. Tabelle XX zeigt einen ganz analogen Fall:

Tabelle XX.

Titriert: 100 ccm Indikator	Stamm-lösung	Acid.-Zuwachs	1 ccm Pankr. 1 Stde.	Acid.-Zuwachs	2 ccm Pankr. 1 Stde.	Acid.-Zuwachs	3 ccm Pankr. 1 Stde.
Nitrophenol							
Spuren	11,1	0,6	11,7	1 2	12,3	1,7	12,8
deutlich. Umschlag . .	11,3	0,7	12,0	1,2	12,5	1,9	13,2
maximaler Umschlag .	11,6	1,2	12,8	1,7	13,3	2,5	14,1
Phenolphthalein							
Spuren	11,8	**1,2**	13,0	**2,1**	13,9	**3,3**	15,1
rosa	12,2	1,0	13,2	1,9	14,1	3,2	15,4
maximaler Umschlag .	13,1	1,1	14,2	2,4	15,5	3,9	17,0
$\frac{v}{f.t}$		**1,2**		**1,05**		**1,1**	

Demgegenüber bringt Tabelle XXI drei Versuche mit den gleichen Mengen Pankreatin, die sich nur durch die Verdauungszeit unterscheiden. Die Tabelle zeigt, daß sich die Aciditätszunahmen auch direkt proportional den Verdauungszeiten verhalten.

Tabelle XXI.

Titriert: 100 ccm / Indikator	Stamm-lösung	Zu-wachs	1 Stde. 1 ccm Pankr.	Zu-wachs	4 Stdn. 1 ccm Pankr.	Zu-wachs	9 Stdn. 1 ccm Pankr.
Nitrophenol							
Spuren	11,1	0,5	11,6	2,4	13,5	4,9	16,0
deutlich. Umschlag . .	11,3	0,5	11,8	2,6	13,9	5,5	16,8
maximaler Umschlag .	11,6	0,8	12,4	3,6	15,2	7,4	19,0
Phenolphthalein							
Spuren	11,8	**0,9**	12,7	**4,3**	16,1	**9,5**	21,3
rosa	12,2	0,8	13,0	4,2	16,4	9,7	21,9
maximale Rotfärbung .	13,1	1,3	14,4	5,1	18,2	11,9	25,0
Konstante berechnet nach $K = \frac{v}{f.t}$ . .		**0,9**		**1,07**		**1,06**	

Zu den gleichen Resultaten führten Versuche, welche mit menschlichem Pankreassaft — durch Öleingießung gewonnen — angestellt wurden und die in den folgenden Tabellen XXII und XXIII wiedergegeben sind:

Tabelle XXII.

Versuch mit menschlichem Pankreassaft (durch Öleingießung gewonnen) / Titriert: 200 ccm	Stamm-lösung	f × t = 5			f × t = 10			f × t = 20		
		5 ccm 1 Stunde	2,5 mm 2 Stunden	1,25 ccm 4 Stunden	10 ccm 1 Stunde	5 ccm 2 Stunden	2,5 ccm 4 Stunden	20 ccm 1 Stunde	10 ccm 2 Stunden	5 ccm 4 Stunden
Phenolphthalein	18,0	18,6	18,9	18,9	20,6	19,8	20,5	23,4	23,3	23,3
Aciditätszuwachs	—	0,6	0,9	0,9	2,6	1,8	2,5	5,4	5,3	5,3
Konstante berechnet nach $K = \frac{v}{f.t}$		0,12	0,18	0,18	**0,26**	0,18	**0,25**	**0,27**	**0,26**	**0,26**

Tabelle XXIII.

II. Versuchsreihe mit menschlichem Pankreassaft. / Titriert: 200 ccm	Acidität der Stamm-lösung	f × t = 4			f × t = 9		
		4 ccm 1 Stde.	1 ccm 4 Stdn.	0,445 ccm 9 Stdn.	9 ccm 1 Stde.	2,25 ccm 4 Stdn.	1,0 ccm 9 Stdn.
Phenolphthalein	18,0	24,8	24,6	25,4	34,9	34,4	34,0
Aciditätszuwachs . . .		6,8	6,6	7,4	16,9	16,4	16,0
Konstante berechnet nach $K = \frac{v}{f.t}$		**1,7**	**1,65**	**1,85**	**1,88**	**1,82**	**1,77**

Auch in diesen Versuchsreihen sehen wir wieder die Gleichheit der Aciditätszunahme, wenn das Produkt $f \times t$ das gleiche bleibt, und das Anwachsen der Säurewerte im geraden Verhältnis zur Größe $f \times t$.

Die im vorstehenden wiedergegebenen Versuche beweisen, daß die Volhardsche titrimetrische Methode der quantitativen Pepsinbestimmung mit einer einfachen, wenig Zeit in Anspruch nehmenden Technik eine befriedigende Genauigkeit der Resultate verbindet,

ferner daß sie unter Anwendung einer sehr einfachen Modifikation auch zum qualitativen und quantitativen Nachweis tryptischer Wirkung verwandt werden kann.

Für das Pepsin wurde mit dieser Methode die Gültigkeit der Schütz-Huppertschen Zeit- und Fermentregel erwiesen, d. h. die absolute Pepsinkonzentration $x = \frac{v^2}{f \cdot t}$. Für das Trypsin dagegen konnten wir die Gültigkeit der Schützschen Regel nicht bestätigen, sondern wir fanden, daß sich die Verdauungswerte bei Anwendung der Volhardschen Methode direkt proportional dem Produkt aus Fermentmenge mal Zeit verhielten: $x = \frac{v}{ft}$.

Die Tatsache, daß dieses Ergebnis mit den Angaben Pawlows über die Trypsinverdauung im Widerspruch steht, genügt, um weitere Versuche über diese Frage nötig erscheinen zu lassen.

Es ist anzunehmen, daß die qualitative und quantitative Trypsinbestimmung an klinischer Bedeutung wesentlich gewinnen wird, nachdem uns Pawlow und Boldireff in neuester Zeit gelehrt haben, auch den menschlichen Bauchspeichel der Untersuchung zugänglich zu machen.

Herrn Privatdozenten Dr. Volhard bin ich für die vielfachen Anregungen und die freundliche Unterstützung, die er mir bei Abfassung der vorliegenden Arbeit hat zuteil werden lassen, zu großem Danke verpflichtet.

IX.

Die Konstitution des Histidins.

Von **F. Knoop** und **A. Windaus.**

Aus der medizinischen Abteilung des chemischen Universitätslaboratoriums zu Freiburg i. B.

Bei unseren Versuchen, durch Einwirkung von Ammoniak auf Traubenzucker Beziehungen zwischen den physiologisch wichtigen Gruppen der Eiweißkörper und der Kohlehydrate zu finden, hatten wir zunächst als Hauptreaktionsprodukt ein Imidazolderivat*) isoliert und waren so vor die Frage gestellt worden, ob dieses stickstoffhaltige Ringsystem etwa eine Rolle in dem Aufbau der Eiweißkörper spielen könne. Eine derartige Möglichkeit war bereits von Pauly**) in seiner Arbeit über die Konstitution des Histidins erörtert worden. Darin hatte er dieser Base zunächst den Charakter eines Dihydropyrimidins, wie ihn S. Fränkel***) auf Grund der Weidelschen Reaktion bewiesen zu haben glaubte, abgesprochen und in scharfsinniger Auseinandersetzung gezeigt, daß alle bisher bekannten Tatsachen am besten mit der Annahme eines Imidazolringes — im Histidin vereinbar seien. Für die Anordnung der übrigen drei Kohlenstoffatome und der Aminogruppe hatte Pauly kein Beweismaterial anführen können; lediglich aus Analogiegründen hatte er das Vorhandensein eines Alaninrestes vermutet und demgemäß für das Histidin die Formel einer α-Amino-β-Imidazolpropionsäure folgender Konstitution zur Diskussion gestellt: Diese hatte zugleich den Vorzug, für die beobachtete Weidelsche und die Pyrrol-Reaktion eine Erklärungsmöglichkeit zu geben.

$$\begin{array}{l} CH{-}NH\diagdown \\ \| \qquad\qquad\quad CH \\ C{-}{-}N\diagup \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

Um zunächst auf experimentellem Wege den Kernpunkt der Annahme Paulys, die Anwesenheit eines Imidazolringes, weiter zu prüfen, haben wir

---

*) Ber. 38, 1166 und Diese Beiträge 6, 392.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 508 (1904).

***) Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. Wien 112, II (1903).

das Histidin mit Natrium und Alkohol behandelt und festgestellt, daß es hierbei nicht angegriffen wird, ein Verhalten, das mit den Eigenschaften der Imidazolderivate übereinstimmt, dagegen sehr gegen die Fränkelsche Formulierung spricht. Denn nach Versuchen von Byk*) erweist sich der Pyrimidinring bei der Reduktion mit Natrium und Alkohol als außerordentlich unbeständig: Methylpyrimidin wird unter den angeführten Bedingungen reduziert und zu Diamidobutan aufgespalten.

Nachdem so das wesentliche Moment der Paulyschen Formel neu gestützt war, hofften wir nunmehr auf synthetischem Wege die Frage nach der Konstitution des Histidins zur Entscheidung bringen zu können. Hierfür sahen wir folgenden Weg:

War die Paulysche Histidinformel (I) richtig, so mußte eine Reduktion des von Fränkel dargestellten Oxydesaminohistidins (II) eine β-Imidazolpropionsäure (III) folgender Konstitution liefern:

```
    I.                    II.                   III.
CH—NH\                CH—NH\                CH—NH\
||     >CH            ||     >CH            ||     >CH
C——N //               C——N //               C——N //
|                     |                     |
CH2                   CH2                   CH2
|                     |                     |
CH.NH2                CHOH                  CH2
|                     |                     |
COOH                  COOH                  COOH
```

Die gleiche, noch unbekannte Säure glaubten wir synthetisch folgendermaßen gewinnen zu können: L. Wolff**) hat aus Lävulinsäure eine Glyoxylpropionsäure (IV) dargestellt, deren Formel als sicher bewiesen gelten kann. Diese sollte sich als Orthodikarbonylverbindung mit Formaldehyd und Ammoniak zu der gesuchten Imidazolpropionsäure (V) kondensieren lassen:

```
         IV.                                 V.
CHO    NH3  H\                         CH—NH\
|             >CH                      ||     >CH
CO     NH3  O//                        C——N //
|                                      |
CH2                       →            CH2
|                                      |
CH2                                    CH2
|                                      |
COOH                                   COOH
```

*) Ber. 36, 1924.

**) Annalen d. Chemie 260, 91.

Wir haben diese Versuche ausgeführt und sind so auf beiden Wegen durch Abbau und durch Synthese zu zwei Säuren gekommen, deren völlige Identität sich durch alle Eigenschaften nachweisen ließ. Die Imidazolpropionsäure kristallisiert gut, besitzt einen scharfen Zersetzungspunkt und liefert eine Reihe gut charakterisierbarer Derivate, von denen wir das Phosphorwolframat, das Nitrat, das Jodid, das Chlorid, das Chloroplatinat und das Kupfersalz anführen.

Durch diese Synthese kann die Konstitution des Histidins bis auf die Stellung der Aminogruppe als aufgeklärt gelten; daß sich diese in α-Stellung zum Karboxyl befindet, wollen wir noch durch einen Oxydationsversuch prüfen, der in dem Falle zu Imidazolessigsäure führen muß.

Experimenteller Teil.

3 mal 2 g Oxydesaminohistidin wurden mit je 12 ccm konzentriertem Jodwasserstoff und 0,6 g rotem Phosphor 8 Stunden im Rohr auf 150° erhitzt, der Rohrinhalt vereinigt und eingedampft und die ausgeschiedene Kristallmasse, die aus dem unreinen Jodhydrat der Imidazolpropionsäure besteht, auf Ton abgesogen. Sie wurde in Wasser gelöst und mit Phosphorwolframsäure in geringem Überschusse gefällt; der Niederschlag wurde aus kochendem Wasser umkristallisiert und fiel beim Erkalten der Lösung in charakteristischen rechteckigen Täfelchen aus. Zersetzungspunkt wenig über 300°. Die Imidazolpropionsäure wurde aus dem Phosphorwolframat nach bekannter Methode freigemacht und schied sich aus dem eingeengten Filtrat auf Acetonzusatz in kleinen derben Prismen an den Gefäßwänden ab. Sie löst sich leicht in Wasser, weniger leicht in Methylalkohol und Äthylalkohol, fast gar nicht in Äther und Aceton und zeigt aus verdünntem Aceton umkristallisiert den Zersetzungspunkt bei 208 bis 209°. Ausbeute etwa 30 Proz.

0,1360 g Substanz (bei 100° getrocknet) liefern: 0,2560 g CO_2
0,0708 „ H_2O — 0,1688 g Substanz: 31,0 ccm N (26°, 746 mm)

$C_6H_8N_2O_2$	Ber.	C 51,36	H 5,75	N 20,04
	Gef.	„ 51,33	„ 5,82	„ 20,00

Mit verdünnter Salpetersäure eingedampft lieferte sie ein kristallisiertes Nitrat in langgestreckten sechsseitigen Blättern, die leicht in Wasser und Methylalkohol löslich, in Äther unlöslich waren und aus methylalkoholischer Lösung mit Äther umgefällt wurden. Je nach der Geschwindigkeit des Erhitzens lag der Zersetzungspunkt zwischen 143 bis 148°.

0,2364 g Substanz: 0,3094 g CO_2, 0,0948 g H_2O —
0,1482 „ „ 27,4 ccm N (22°, 745 mm)

$C_6H_8N_2O_2 . HNO_3$	Ber.	C 35,44	H 4,46	N 20,73
	Gef.	„ 35,69	„ 4,48	„ 20,52

Das Chloroplatinat scheidet sich in gelbroten, charakteristischen Würfeln ab, die sich ziemlich leicht in heißem Wasser lösen und bei 209° unter Zersetzung schmelzen.

0,2129 g Substanz liefern 0,0600 Pt.

$(C_6H_8N_2O_2)_2 . H_2PtCl_6$ Ber. Pt 28,24
Gef. „ 28,18

Die Imidazolpropionsäure liefert ferner mit Chlorwasserstoff und Jodwasserstoff in Wasser lösliche kristallinische Salze und gibt wie Histidin mit Quecksilber- und Silbersalzen in alkalischer Lösung amorphe Fällungen. Das Silbersalz löst sich in Ammoniak und Essigsäure leicht auf. Das Kupfersalz kristallisiert aus heißem Wasser in kleinen blauen Nädelchen.

Synthese der Imidazolpropionsäure.

Lävulinsäure wurde nach den Angaben von Wolff in Dibromlävulinsäure und diese durch Kochen mit Wasser in Glyoxylpropionsäure übergeführt. Zu dieser Säure wurde in wässeriger Lösung die einem Molekül entsprechende Menge Formaldehyd hinzugesetzt und dem Gemisch etwas mehr als drei Moleküle konzentriertes Ammoniak tropfenweise hinzugefügt. Das Gemisch blieb einen Tag stehen und wurde dann auf dem Wasserbade eingeengt und mit Essigsäure mehrfach eingedampft. Der Rückstand wurde mit wenig Wasser aufgenommen, mit Methylalkohol von unlöslichen, stark gefärbten Beimengungen befreit und lieferte nun aufs neue eingedampft in einzelnen Fällen direkt eine Kristallisation, die auf Ton abgesaugt, mit Blutkohle entfärbt und aus wässeriger Lösung mit Aceton rein abgeschieden werden konnte. In anderen Fällen mußte die Reinigung wie oben über das Phosphorwolframat geschehen, das sich durch seine Löslichkeit in heißem Wasser von reichlichen, mitgefällten Beimengungen trennen ließ. — In beiden Fällen besaß die freie Säure alle Eigenschaften des Histidinderivates. Ausbeute etwa 10 Proz.

0,1880 g Substanz: 0,3510 g CO_2, 0,0990 g H_2O
0,1598 „ „ 28,8 ccm N (20°, 737 mm)

$C_6H_8N_2O_2$	Ber.	C 51,36	H 5,75	N 20,04
	Gef.	„ 50,92	„ 5,89	„ 20,01.

Auch das Phosphorwolframat, das Nitrat und das Chloroplatinat zeigen in bezug auf Kristallform, Löslichkeit und Schmelzpunkt genau die gleichen Eigenschaften, wie die oben erwähnten Salze, sodaß an der Identität der beiden Säuren kein Zweifel möglich ist.

Das Chloroplatinat gab folgende Zahlen:

0,3105 g Substanz liefern 0,0875 g Pt.

$(C_6H_8N_2O_2)_2H_2PtCl_6$. Ber. Pt 28,24
Gef. „ 28,18.

Kürzere Mitteilungen.

1. Über die Darstellung der Taurocholsäure.

Von **Ivar Bang**, (Lund, Schweden).

In seiner Arbeit „Über die Darstellung kristallisierter Taurocholsäure" hat Hammarsten*) eine Methode mitgeteilt, welche diese bisher vergebens versuchte Darstellung sehr leicht auszuführen gestattet, vorausgesetzt, daß man über reines Taurocholat verfügt.

Gerade diese Bedingung ist aber bei der am besten zugänglichen Galle, der Rindergalle, eine nicht ganz einfache Sache und Hammarsten bemerkt auch deshalb Seite 137: „Die Reingewinnung des Taurocholates aus der Rindergalle ist mit großen Schwierigkeiten verknüpft, und darum eignet sich auch diese Galle, so lange die Methode nicht besser ausgearbeitet worden ist, nicht gut zur Darstellung der Taurocholsäure". Weiter bemerkt er Seite 139: „die Methode zur Reingewinnung des Taurocholates aus Rindergalle muß also noch weiter ausgearbeitet werden".

Eine solche wie ich glaube einfache Methode soll hier mitgeteilt werden.

Bekanntlich gehört die Taurocholsäure zu den sogenannten eiweißfällenden Substanzen. Eine Eiweißlösung mit Taurocholsäure versetzt gibt einen reichlichen Niederschlag, eine Tatsache, welcher für die Verdauung eine gewisse Bedeutung zugeschrieben worden ist.

Dieser Niederschlag besteht aus einer Verbindung der Taurocholsäure mit Eiweiß, die sowohl von Mineralsäuren als von Alkalien wieder in Eiweiß und Taurocholsäure zerlegt wird. Da weiter die Glykocholsäure Eiweiß nicht fällt und keine unlösliche Eiweißverbindung gibt, läßt sich hierauf eine Methode zur Darstellung der Taurocholsäure gründen.

Man untersucht erst, ob die Rindergalle bei Versetzen mit Salzsäure einen Niederschlag von Glykocholsäure gibt; wenn dies nicht der Fall ist (bei weitem das gewöhnliche), ist die Galle direkt brauchbar. Man nimmt weiter das gleiche Volum Serum, verdünnt 4 bis 5 mal mit Wasser unter Zusatz von Salzsäure (zur Lösung der Globuline) und fügt die Rindergalle auf einmal hinzu. Bei weiterem Ansäuren bildet sich ein voluminöser Niederschlag. Dieser wird durch Dekantation und Auswaschen von der Glykocholsäure befreit (bis im Filtrate Pettenkofers Probe negativ ausfällt) und kann jetzt mit 2proz. Salzsäure oder Alkali zerlegt werden. Am einfachsten dürfte man dabei in folgender Weise vorgehen. Der Niederschlag wird mit $^1/_2$ bis 1 Liter 2proz. Salzsäure angerührt und eine Stunde geschüttelt, dann wird filtriert und mit Kochsalz gesättiget. Ge-

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie 43, 127.

wöhnlich geht nur eine Spur von Eiweiß in die salzsaure Lösung, weshalb man bei der Kochsalzsättigung auch nur eine verschwindend geringe Fällung beobachtet. Es wird filtriert, mit Äther versetzt und geschüttelt. Nach kurzer Zeit kristallisiert die Taurocholsäure in schön ausgebildeten, zentimeterlangen Kristallnadeln aus.*)

Die kristallisierte Taurocholsäure kann man wieder nach Hammarsten umkristallisieren und reinigen. Da meine Erfahrungen über die Taurocholsäure aus Rindergalle in allem übrigen mit Hammarstens Angaben übereinstimmen, brauche ich nur auf die betreffende Abhandlung zu verweisen.

---

2. Über Präzipitine.

Von **Ivar Bang**, (Lund, Schweden).

Da das Präzipitin vom chemischen Standpunkte aus beinahe unbearbeitet ist, habe ich seit längerer Zeit verschiedene Untersuchungen darüber angestellt. Leider bin ich aber zu ganz unbefriedigenden Resultaten gelangt und habe infolgedessen das Gebiet verlassen. Eine Beobachtung dürfte vielleicht doch einer kurzen Publikation wert sein.

Zwei Serien Kaninchen wurden mit Injektionen von Rinderblutserum behandelt. Die eine Serie umfaßte 3 Kaninchen, die andere 5. Die Präzipitinbildung war in beiden Serien eine reichliche.

Zur Darstellung des Präzipitins ging ich von der Voraussetzung aus, daß man vielleicht das Präzipitin durch einen Serumeiweißkörper mit anderen Fällungsgrenzen ausfällen und das Präzipitat weiter in einem Minimum von Säure oder Lauge lösen könnte. Wäre dann das Präzipitat eine reversible Verbindung, könnte man möglicherweise aus dieser Lösung das Präzipitin aussalzen.

Die erste Aufgabe war also, das Präzipitin nach seinen Fällungsgrenzen zu charakterisieren. Das Präzipitin fällt mit der Euglobulinfraktion. Bei der Dialyse bleibt es weiter ganz in dem wasserlöslichen Teil (weshalb man es auch früher als Pseudoglobulin angesehen hat). Endlich läßt sich das Präzipitin vollständig durch Kochsalzsättigung aussalzen. Reiner, aber noch gar nicht rein, erhält man das Präzipitin, wenn man nach der Salzfraktionierung und Dialyse die Lösung erhitzt. Bei 64° koaguliert viel Eiweiß und im Filtrate findet sich das Präzipitin unverändert.

Versetzt man eine solche Lösung mit einer Pseudoglobulinlösung, so entsteht ein Niederschlag, den man auswaschen kann und der sich leicht im Wasser bei Zusatz einer Spur Natronlauge löst. Bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat bildet sich auch eine Fällung, welche im Wasser jedenfalls teilweise löslich ist. Doch findet sich sicher nicht das Präzipitin mit unveränderten Eigenschaften in dieser Lösung, obwohl auch hier das spezifische Eiweiß einen Niederschlag hervorbringt. Das gleiche ist nämlich auch der Fall bei Zusatz von ganz anderem Eiweiß z. B. Ovalbumin.

---

*) Enthält die Lösung wenig Taurocholsäure, kann man sie zuerst als Taurocholat durch Neutralisation des Kochsalzfiltrates ausscheiden, wieder in Wasser lösen u. s. f.

In dieser Beziehung verhielt sich das Präzipitin beider Kaninchenserien ganz identisch. In einem anderen Punkte war aber ein ganz erheblicher Unterschied zu beobachten. Während das Präzipitin von Serie I mit Serumalbumin eine fast gleich grosse Fällung wie mit dem Globulin ergab, bekam ich mit der Serie II beim Zusatz von Serumalbumin überhaupt keinen Niederschlag.

Diese Beobachtung hat mich zu vorliegender Veröffentlichung veranlasst, da bekanntlich die Auffassungen über die Bedeutung der verschiedenen Serumeiweißkörper bei der Präzipitation weit auseinandergehen. Einige Forscher haben gefunden, daß alle Eiweißkörper mit dem Präzipitin Niederschläge geben, andere dagegen, daß nur die Globuline, besonders das Pseudoglobulin wirksam sind, wenn man die Tiere mit Vollblut immunisiert hat. Wie man aus meiner Beobachtung sieht, kommen beide Fälle vor. Daß aber unter gleichen Bedingungen die Resultate so weit differieren, hat mich zu der Überzeugung geführt, daß eine chemische Bearbeitung vorläufig nicht lohnend ist.

---

3. Über die Bedingungen der Acetonbildung.

Von Dr. **R. Waldvogel**, Privatdozent, Göttingen.

In seinen Studien über die Bedingungen der Acetonbildung (Diese Beiträge **6**) bemerkt G. Satta, S. 380, mit Bezug auf den Einfluß verschiedener Kohlenhydratsorten: „Die von Waldvogel hervorgehobene Erscheinung darf einstweilen nicht von dem Unterschied der Konstitution der verschiedenen Kohlehydratsorten abgeleitet werden, für deren besondere antiketogene Bedeutung die Begründung fehlt, sondern eher von den individuellen Verhältnissen der Versuchsperson". Hierzu erlaube ich mir nachstehendes zu bemerken:

Auch ich habe nie behauptet, daß der Unterschied der Kohlenhydrate in ihrem acetonvermindernden Einfluß auf ihre Konstitution zurückzuführen sei. In meiner ersten Arbeit über diesen Gegenstand heißt es (Zeitschr. f. klin. Med. 38): „Man würde danach wohl daran denken müssen, daß die eingeführten Kohlenhydrate in ihrer Beziehung zur Acetonurie nicht gleichwertig sind" und ferner in meiner Monographie „Die Acetonkörper", Stuttgart 1903, S. 76, nach neuerdings angestellten Versuchen: „Die Verhältnisse sind aber durchaus nicht so durchsichtig, daß wenige Versuche über den Wert der einzelnen Kohlenhydrate entscheiden können, der oxydative persönliche Faktor, die verschiedene Größe der zu beeinflussenden Acetonausscheidung, die wechselnden Verhältnisse der Resorption trüben das Urteil." Gerade der letzte Satz stimmt mit Sattas Anschauung völlig überein, er hätte wohl, sobald meine Stellung zu der Frage berührt wurde, angeführt werden müssen, ebenso wie S. ja auch in dem Abschnitt über den Entstehungsort der Acetonkörper meine Ansicht aus der Monographie entnimmt und widerlegt.

Das Bestehen einer toxischen Acetonurie deswegen nicht anerkennen zu wollen, weil „es sich im allgemeinen bei den Infektionskrankheiten, die als recht toxisch zu bezeichnen sind, nicht um eine Vermehrung der Fett- sondern vielmehr der Eiweißzersetzung handelt" erscheint mir nicht

angängig. Mit einer toxischen Fetteinschmelzung ist bislang deswegen zu wenig gerechnet worden, weil man die Acetonkörper nicht als Fettabkömmlinge ansah; die Größe des Gewichtsverlustes z. B. bei kurz dauernden Infektionen mit relativ guter Nahrungsaufnahme, bei der jedenfalls unter normalen Verhältnissen eine größere Acetonurie nicht auftreten würde, zwingt uns doch wohl, auch an einen auf das Fett wirkenden Einfluß der Toxine zu denken, zumal viele Autoren unter diesen Verhältnissen Acetonurie fanden. Man müßte meine Annahme, wie ich sie durch Experimente zu stützen versuchte, auch durch Versuche widerlegen.

Satta glaubt ferner durch einen Versuch nachzuweisen, daß die Glykose auch subkutan die Acetonmenge herabsetzt, er findet, daß 125 g Traubenzucker unter die Haut gebracht die Acetonausscheidung im Harn von 1,40 g auf 0,81 g herabdrücken. Dieser Versuch ist ohne Beweiskraft, denn es fehlen hier wie in der ganzen Arbeit die Bestimmungen des Acetons in der Atemluft. Vor mir haben namhafte Untersucher durch gründliche Versuche festgestellt, daß bei gemischter Kost die Acetonmenge in der Atemluft die des Urins weit übertrifft. Hieran sind, wie ich annehme, die Kohlenhydrate schuld, denn sie sind es, welche, auch wenn sie die Gesamtacetonmenge noch nicht herabsetzen, ihre geringste Wirkung auf die Acetonkörper schon darin äußern, daß, während in der Inanition mehr Aceton mit dem Urin als mit der Atemluft den Körper verläßt, dies Verhältnis sich wieder wie bei gemischter Kost zugunsten der Atemluft umkehrt. Diesen ganz schwachen Einfluß der Kohlenhydrate habe ich auch in den Versuchen von Bendix und Dreger mit Pentosen erkannt (Siehe meine Monographie S. 79), sodaß diese Versuche, wie ich im Gegensatz zu Satta meine, mit denen von Mohr und Loeb sehr wohl übereinstimmen. Man wird aus diesen wenigen Angaben erkennen, wie wichtig grade die Bestimmung des Acetons in der Atemluft ist, wenn es sich darum handelt, den vermindernden Einfluß der verschiedenen Kohlenhydrate auf die Acetonkörperausscheidung festzustellen, ferner daß die geringe Differenz in dem Versuch von Satta durch eine geringe Zunahme des Acetons in der Atemluft überkompensiert sein kann und daß eine „antiketogene“ Wirkung der subkutan einverleibten Glykose nicht sichergestellt ist. Ich habe mich übrigens in meiner Monographie, S. 64, wie ich glaube, zurückhaltend genug ausgedrückt, wenn ich schrieb „Wenn auch weitere Versuche in dieser Richtung sehr erwünscht erscheinen, so möchte ich doch vorläufig glauben, daß die Wirkung der Kohlenhydrate und Fette auf die Entstehung der Acetonkörper nur dann möglich erscheint, wenn sie sich im Magendarmkanal aufhalten“. Der einzige Versuch, den Satta angestellt hat, dürfte vorläufig an diesem Satz nichts ändern.

---

4. Über das Verhalten von Fermenten zu kolloidalen Lösungen.

Von **Dr. Emil Reiß,** (Frankfurt a. M.).

Im Anschluß an die jüngst erschienene Arbeit von Dauwe*) „Über die Absorption der Fermente durch Kolloide“, worin wesentlich auf gequollene feste Kolloide Rücksicht genommen wird, möchte ich an dieser

*) Diese Beiträge 6, 426.

Stelle auf Versuche hinweisen, die ich über das Verhalten von Fermenten zu kolloidalen Lösungen mit analogem Ergebnis ausgeführt habe. Ich*) habe Lezithin in chloroformiger Lösung mit verschiedenen Fermentlösungen geschüttelt. Nach sauberer Trennung der entstandenen Schichten konnte nachgewiesen werden, daß Lab sowohl wie Trypsin zum Teil in die Chloroformlezithinlösung übergingen, während Versuche mit anderen Lösungsmitteln erfolglos blieben. Allerdings konnte der Nachweis, daß die Chloroformlecithinlösung ein Kolloid ist, damals nicht mit Sicherheit erbracht werden. Doch haben die Versuche es zum mindesten sehr wahrscheinlich gemacht, daß hier ein Ferment aus seiner wässerigen Lösung oder Suspension in eine kolloidale Flüssigkeit übergeht.

Der entgegengesetzte Fall ließ sich in der Milch an einem anderen Ferment demonstrieren, nämlich an der Katalase, die Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und Sauerstoff zerlegt **) Dieses Ferment adhäriert in der Milch den Milchkügelchen und ist demzufolge im Rahm in größerer Menge enthalten als in der Magermilch. Trennt man aber die Milchkügelchen von dem Milchplasma und übergießt sie mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung, so geht das Ferment fast quantitativ in diese Flüssigkeit über. In diesem Falle also bedingen die Kolloide des Milchplasmas ein Ausfallen des Ferments, das in kolloidfreien Flüssigkeiten gut löslich ist. Die Milchkügelchen spielen hier nur eine sekundäre Rolle, die beispielsweise auch von Kieselgur übernommen werden kann. Bezüglich der Frage, ob bei den genannten Vorgängen Adsorption oder Teilung zwischen zwei Lösungsmitteln im Spiele ist, muß auf die Originalarbeiten verwiesen werden.

*) Eine Beziehung des Lezithins zu Fermenten. Berl. Klin. Wochenschr. 1904, Nr. 45.
**) Die Katalase der Milch. Zeitschr. f. klin. Medizin 56, H. 1 u. 2, (1905).

Berichtigung.

Bd. VI S. 394 soll die in der Fußnote für Parasacharin angeführte Formel richtig heißen:

$$CHOH . CH_2OH_2$$
$$COH . COOH$$
$$CH_2 . CH_2OH.$$

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

VII. Band. 4., 5. u. 6. Heft
(Ausgegeben Oktober 1905)

Braunschweig
Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1905.

Inhalt des 4., 5. u. 6. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 2 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 5,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

X.

Beobachtungen über den Wiederersatz der Bluteiweißkörper.

Von Dr. P. **Morawitz**, Assistenzarzt.

Aus der medizin. Klinik zu Straßburg. (Prof. Dr. v. Krehl.)

Die Frage nach der Herkunft der Eiweißkörper des Blutplasmas ist in den letzten Jahren vielfach Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Zahlreiche Forscher, Burckhardt*), Wallerstein**), Lewinski***) und Githens†) haben sich bemüht, durch verschiedenartige Versuchsanordnung einen Einblick in die Verhältnisse der Bildung der Bluteiweißkörper zu gewinnen, indem sie besonders den Einfluß von Nahrungs- und Blutentziehungen auf den Gesamteiweißgehalt und auf das Verhältnis der Globuline zu den Albuminen studierten.

Diese Untersuchungen haben im wesentlichen die Ansicht befestigt, daß die Albumine zu den als Nahrung aufgenommenen Eiweißkörpern in näherer Beziehung stehen als die Globuline, von denen man annehmen kann, daß sie erst durch weitergehende chemische Veränderungen des Nahrungseiweißes in den Körperzellen sich bilden. Seitdem jedoch Moll††) kürzlich gezeigt hat, daß sehr geringfügige Eingriffe, wie z. B Einwirkung minimaler Alkalimengen bei etwas erhöhter Temperatur hinreichen, um aus Albuminen Körper mit den wesentlichen Charakteren der Globuline zu bilden, ist gewiß auch daran zu denken, daß ein Übergang von Albuminen in Globuline im Blute stattfindet.

---

*) Burckhardt, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **16**, 322.
**) Wallerstein, I.-D. Straßburg 1902.
***) Lewinski, Pflügers Archiv **100**, 611.
†) Githens, Diese Beiträge **5**, 515.
††) Moll, Diese Beiträge **4**, 563.

**

Obwohl durch die oben angeführten Untersuchungen einige Tatsachen als sichergestellt angesehen werden können, wie z. B. die Vermehrung der Globuline im Hunger, haben bisher Methoden gefehlt, um den wesentlichsten Problemen nahe zu treten, z. B. der Frage nach der Bildung der Plasmaeiweißkörper, nach den Beziehungen von Albuminen und Globulinen zu einander und nach der Bedeutung der Eiweißkörper des Blutplasmas für den Stoffwechsel. Die Beantwortung dieser Fragen scheitert vorerst an technischen Schwierigkeiten. Selbst für den am besten charakterisierten Eiweißkörper, das Fibrinogen, sind nur sehr wenige sichergestellte Tatsachen bekannt, die sich im wesentlichen auf die Schnelligkeit seines Wiederersatzes und auf eine gewisse Abhängigkeit von der Menge der zirkulierenden Leukocyten beziehen*). Nach A. Schmidt**) sollen auch die Globuline aus den Elementen des zirkulierenden Blutes hervorgehen, eine Ansicht, für die ein ausreichender Beweis vorerst noch aussteht.

Das schon seit längerer Zeit bekannte Verschwinden des Fibrinogens bei der Phosphorvergiftung***) dürfte durch das Vorhandensein eines fibrinolytischen Fermentes im Blut hinreichend erklärt sein und läßt keine Schlüsse auf die Bedeutung bestimmter Organe für den Wiederersatz des Fibrinogens zu.

In den folgenden Versuchen stellte ich mir die Aufgabe, die zeitlichen Beziehungen des Wiederersatzes der Plasmaeiweißkörper hungernder Tiere nach sehr starken Blutentziehungen und das Verhalten der Albumine zu den Globulinen zu ermitteln.

In den recht zahlreichen bisher in dieser Richtung ausgeführten Versuchen wurde zur Blutentziehung der einfache Aderlaß, event. mit nachfolgender Injektion entsprechender Mengen isotonischer Salzlösung zur Herabsetzung des Eiweißgehaltes des Blutplasmas angewendet. Aus naheliegenden Gründen gelingt es auf diese Weise natürlich nicht sehr erhebliche Ausschläge zu erhalten. Ich beschloß daher in der Weise vorzugehen, daß ich kleine Hunde mit gewaschenen Erythrocyten großer Hunde durchblutete, wodurch es möglich wurde, eine sehr starke Verarmung des Plasmas an Eiweißkörpern zu erzielen und größere Ausschläge zu erhalten, als bisher erreicht worden sind.

---

*) Dastre, C. r. Soc. de biol. **45**, 71. — Moll, Wiener klin. Wochenschrift 1903, Nr. 44. — Langstein u. Mayer, Diese Beiträge **5**, 69.

**) A. Schmidt, Weitere Beiträge zur Blutlehre. Leipzig 1895.

***) Corin u. Ansiaux, Unters. über Phosphorvergiftung. Vierteljahrsschrift f. gerichtl. Medizin 1894. — Jakoby, Zeitschrift f. physiol. Chemie **30**, 1900.

Methodisches.

Großen Hunden (20 bis 30 kg) wurden möglichst ausgiebige Aderlässe gemacht, wobei im Durchschnitt etwa 800 bis 1000 ccm Blut gewonnen wurden, ohne daß die Tiere zugrunde gingen. Dieselben konnten zu mehrfachen Aderlässen benutzt werden.

Das Blut wurde abzentrifugiert, der Blutkörperchenbrei zweimal mit Kochsalzlösung gewaschen und in Lockescher Lösung suspendiert. Diese Suspension wurde auf 38° erwärmt einem kleinen Hunde (4 bis 6 kg) in die Vena jugulares infundiert, nachdem zunächst an der Carotis ein ausgiebiger Aderlaß gemacht worden war. Während der Infusion der Blutkörperchenaufschwemmung wurden fortwährend aus der Carotis die entsprechenden Blutmengen entnommen, sodaß die Tiere zum Schluß genau die gleiche Flüssigkeitsmenge in den Gefäßen behielten, die sie im Anfang gehabt hatten.

Das Plasma einer Portion Blut, die vor Beginn der Durchspülung entnommen und in Kaliumoxalatlösung aufgefangen war, und eine Blutprobe unmittelbar nach Schluß der Durchspülung wurden zur quantitativen Eiweißbestimmung verwandt.

Die Trennung der Albumin- und Globulinfraktion geschah nach der von Spiro und Porges*) und Githens (loc. cit.) beschriebenen Methode mit Natriumsulfat und Bestimmung des Stickstoffs im Filtrat nach Kjeldahl.

In bestimmten Zeitinterwallen wurden den Tieren, die keine Nahrung erhielten, neue Aderlässe gemacht und das Plasma in derselben Weise verarbeitet.

Das Plasma war unmittelbar nach der Durchspülung meist leicht rötlich gefärbt. Die Färbung verschwand im Verlaufe weniger Stunden oder eines Tages.

Es fiel auf, daß die Tiere den Eingriff anfangs meist gut vertrugen, umhergingen, allmählich aber Zeichen zunehmender Schwäche aufwiesen und nach kürzerer oder längerer Zeit zugrunde gingen. Man könnte geneigt sein, den Tod der Tiere auf Verarmung des Plasmas an Eiweiß zu beziehen. Daß hierbei jedoch im wesentlichen physikalische Verhältnisse ausschlaggebend sind, beweist die Tatsache, daß alle Tiere am Leben blieben, seitdem ich der zum Durchspülen verwandten Lockeschen Lösung 3 Proz. Gummi arabicum hinzusetzte.**) Sobald die Lösung dadurch annähernd isoviskös gemacht worden war, vertrugen die Tiere den Ersatz eines großen Teiles ihres Blutes durch Lockesche Lösung sehr gut, selbst wenn der Eiweißgehalt des Plasmas auf 2 Proz. herabgedrückt worden war.

---

*) Spiro u. Porges, Diese Beiträge 3, 277.

**) Heffter, Archiv f. exper. Path. u. Pharm. 29, 41.

Versuch IV.

Prozente	Vor der Durchspülung	sofort danach	3 Std. danach	17 Std. danach	24 Std. danach.
7					
6					
5					
4					
3					
2					
1					
0					

+——— Gesamteiweiß o—·—·— Albumin
•·········· Globulin ×– – – – Eiweißquotient

Versuch VI.

Prozente	Vor der Durchspülung	Nach der Durchspülung	3 Std. später	18 Std. später
7				
6				
5				
4				
3				
2				
1				
0				

+——— Gesamteiweiß o—·—·— Albumin
•·········· Globulin ×– – – – Eiweißquotient

Versuche.

Es wurden im ganzen 9 Versuche dieser Art angestellt. Die ersten beiden Versuche scheiden aus, weil die Tiere nicht so lange lebten, daß sich eine bestimmbare Veränderung der Eiweißkörper bereits hätte geltend machen können.

1. Versuch III. 14. II. 05.

Hund von 6 kg wird mit 500 ccm gewaschener roter Blutkörperchen ohne Gummizusatz durchspült.

I. Plasma enthält vor der Durchspülung:

Eiweiß = 5,653 Proz.
davon Albumine = 3,28 „ } Eiweißquotient
Globuline = 2,37 „ } 1,38.

II. Plasma unmittelbar nach der Durchspülung enthält:

Eiweiß = 3,049 Proz.
davon Albumine = 1,974 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,075 „ } 1,83.

III. Plasma 3 Stunden nach Vollendung der Durchspülung enthält:
Eiweiß = 3,873 Proz.
davon Albumine = 2,427 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,446 „ } 1,64.

IV. Hund geht im Verlauf der Nacht zugrunde, wird noch nicht steif um 8 Uhr morgens im Käfig gefunden.

Plasma 15 Stunden nach der Durchspülung enthält:
Eiweiß = 4,59 Proz.
davon Albumine = 3,381 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,214 „ } 2,78.

2. Versuch IV. 28. II.

Hund von 4,5 kg wird mit 500 ccm gewaschener roter Blutkörperchen ohne Gummizusatz durchspült.

I. Plasma enthält vor der Durchspülung:
Eiweiß = 5,642 Proz.
davon Albumine = 3,744 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,898 „ } 1,97.

II. Plasma unmittelbar nach der Durchspülung:
Eiweiß = 3,062 Proz.
davon Albumine = 2,034 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,03 „ } 1,97.

III. Plasma enthält nach 3 Stunden:
Eiweiß = 4,284 Proz.
davon Albumine = 3,192 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,09 „ } 2,93.

IV. Plasma enthält nach 18 Stunden:
Eiweiß = 4,848 Proz.
davon Albumine = 3,276 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,57 „ } 2,09.

Der Hund wird darauf getötet.

3. Versuch V. 7. III.

Hund von 5 kg wird mit 500 ccm Blutkörperchenaufschwemmung durchblutet.

I. Plasma vor Beginn der Durchblutung:
Eiweiß = 4,77 Proz.
davon Albumine = 3,52 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,25 „ } 2,81.

II. Unmittelbar nach der Durchblutung:
Eiweiß = 2,791 Proz.
davon Albumine = 1,988 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,803 „ } 2,47.

III. Nach 3 Stunden:
Eiweiß = 3,409 Proz.
davon Albumine = 2,90 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,5 „ } 5,8.

IV. Nach 8 Stunden:
Eiweiß = 3,636 Proz.
davon Albumine = 2,9 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,73 „ } 3,9.

V. Nach 20 Stunden:

Eiweiß = 4,145 Proz.
davon Albumine = 3,13 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,01 „ } 3,1.

4. Versuch VI. 17. III.

Hund von 6 kg wird mit 600 ccm Blutkörperchenaufschwemmung durchblutet. Der Lockeschen Lösung war 1,5 Proz. Gummi zugesetzt.

I. Vor der Durchblutung:

Eiweiß = 4,984 Proz.
davon Albumine = 3,23 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,75 „ } 2,8.

II. Unmittelbar nach der Durchblutung:

Eiweiß = 2,177 Proz.
davon Albumine = 1,62 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,55 „ } 2,95.

III. Nach 3 Stunden:

Eiweiß = 2,9 Proz.
davon Albumine = 2,34 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,56 „ } 4,2.

IV. Nach 17 Stunden:

Eiweiß = 3,078 Proz.
davon Albumine = 2,155 „ } Eiweißquotient
Globuliue = 0,923 „ } 2,3.

V. Nach 24 Stunden:

Eiweiß = 3,677 Proz.
davon Albumine = 2,36 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,21 „ } 1,9.

Hund bleibt am Leben.

5. Versuch VII. 21. III.

Hund von 5 kg wird mit 1200 ccm gummihaltiger Blutkörperchenaufschwemmung durchblutet.

I. Vor der Durchblutung:

Eiweiß = 5,353 Proz.
davon Albumine = 3,628 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,725 „ } 2,1.

II. Nach der Durchblutung:

Eiweiß = 2,14 Proz.

III. Nach 3 Stunden:

Eiweiß = 2,835 Proz.

(Zahlen für Globuline und Albumine in diesen beiden Proben verloren.)

IV. Nach 18 Stunden:

(Es hat sich wieder so viel Fibrinogen gebildet, daß das Blut bereits wieder in toto gerinnt, während vorher nur ein kleines zartes Flöckchen Fibrin gebildet worden war.)

Eiweiß = 3,289 Proz.
davon Albumine = 2,283 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,006 „ } 2,3.

V. Nach 30 Stunden:

Eiweiß = 4,741 Proz.
davon Albumine = 2,66 „ } Eiweißquotient
Globuline = 2,08 „ } 1,2.

VI. Nach 52 Stunden:

Eiweiß = 5,735 Proz.
davon Albumine = 3,034 „ } Eiweißquotient
Globuline = 2,701 „ } 1,1.

Hund durch Verbluten getötet.

6. Versuch VIII. 28. III.

Hund von 7 kg wird mit 900 ccm Blutkörperchenaufschwemmung in 3proz. Gummilösung durchblutet.

I. Plasma vor dem Versuch:

Eiweiß = 5,557 Proz.
davon Albumine = 3,55 „ } Eiweißquotient
Globuline = 2,0 „ } 1,77.

II. Unmittelbar nach der Durchblutung:

Eiweiß = 2,87 Proz.
davon Albumine = 1,81 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,86 „ } 2,1.

III. Nach 4 Stunden:

Eiweiß = 3,375 Proz.
davon Albumine = 2,47 „ } Eiweißquotient
Globuline = 0,9 „ } 2,7.

IV. Nach 24 Stunden:

Eiweiß = 4,184 Proz.
davon Albumine = 2,70 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,48 „ } 1,82.

7. Versuch IX. 14. IV. 05.

Hund von 6 kg wird mit 600 ccm Blutkörperchenaufschwemmung in 3proz. Gummilösung durchspült.

I. Plasma vor der Durchspülung:

Eiweiß = 5,968 Proz.
davon Albumine = 3,316 „ } Eiweißquotient
Globuline = 2,65 „ } 1,25.

II. Nach der Durchspülung:

Eiweiß = 3,413 Proz.
davon Albumine = 2,4 „ } Eiweißquotient
Globuline = 1,0 „ } 2,4.

Der Hund hungert 4 Tage und wird darauf von neuem durchspült mit 700 ccm Blutkörperchenaufschwemmung.

I. Plasma vor dem Aderlaß:

Eiweiß = 6,125 Proz.
davon Albumine = 4,45 „ } (?)
Globuline = 1,67 „ }

II. Nach der Durchspülung:

Eiweiß = 3,03 Proz.
davon Albumine = 1,74 „ } (?)
Globuline = 1,26 „ }

Hund wird nach 3 Tagen Hungerns durch Verbluten getötet.

I. Eiweiß = 5,41 Proz.
davon Albumine = 2,62 „ } (?)
Globuline = 2,79 „ }

Die vorstehenden Versuche zeigen folgendes:

1. Es gelingt, den Eiweißgehalt des Blutplasmas mit Hilfe der oben beschriebenen Methode von etwa 6 Proz. bis auf weniger als 2 Proz. herabzudrücken. Die Tiere sind nach dem Eingriff zwar ziemlich schlaff, gehen aber nicht zugrunde, sofern man die Viskosität der Blutflüssigkeit durch Hinzusetzen von 3 Proz. Gummi arabicum zur Lockeschen Lösung nicht zu gering werden läßt.

In den ersten 3 Versuchen, von denen hier nur einer mitgeteilt ist, starben die Hunde bald nach dem Eingriff, obschon der Eiweißgehalt nicht tiefer herunter gegangen war, als bei den später operierten Tieren, welche die Durchspülung ohne dauernden Schaden ertrugen. Es ist nicht zu zweifeln, daß man durch Verwendung größerer Mengen von Durchspülungsflüssigkeit und durch sorgfältigeres Waschen der Blutkörperchen den Eiweißgehalt des Plasmas noch tiefer wird herabsetzen können.

2. Der Organismus hat die Fähigkeit, den normalen Eiweißgehalt des Plasmas nach künstlicher Herabsetzung desselben wiederherzustellen, und zwar auch im Hunger. Dieser Wiederersatz der Plasmaeiweißkörper ist in den ersten Stunden nach dem Aderlaß weitaus am lebhaftesten, was aus allen Versuchen übereinstimmend hervorgeht. Später erfolgt der Anstieg wesentlich langsamer. Aus den Versuchen VII und IX geht hervor, daß bei Herabsetzung des Plasmaeiweißes auf etwa die Hälfte oder weniger in $2^1/_2$ bis 4 Tagen der hungernde Organismus des Hundes seinen früheren Eiweißgehalt erreichen oder sogar etwas überschreiten kann.

Der Versuch IX ergibt ferner, daß der Wiederersatz des Plasmaeiweißes im hungernden Organismus auch nach zweimaliger Wiederholung der Durchspülung möglich ist.

3. Der Wiederersatz der Albumine und Globuline des Blutplasmas findet nicht gleichmäßig statt.

In den ersten Stunden nach der Durchspülung findet eine starke Vermehrung der durch die Salzfällungsmethode als Albumine charakterisierten Eiweißkörper statt; die so schnell eintretende Vermehrung des Gesamteiweißes ist fast ausschließlich durch diese Albuminvermehrung bedingt. Die Kurven der Versuche, von denen jene zu Versuch IV und VI oben mitgeteilt sind, zeigen dieses Verhalten, soweit sie verwertbar sind, vollständig übereinstimmend.

Die später eintretende langsame Zunahme der Plasmaeiweißkörper beruht dagegen vornehmlich auf einer Vermehrung der Globuline, während die Menge der Albumine nur sehr langsam zunimmt oder sogar sich etwa konstant erhält.

Entsprechend diesem Verhalten der Albumine und Globuline steigt der Eiweißquotient kurz nach der Durchspülung rapide an, um dann langsam abzusinken und entweder seinen früheren Wert etwa wieder zu erreichen oder aber noch tiefer herabzugehen, wie in den länger dauernden Versuchen VII und IX (auch in IV angedeutet). Es bedeutet das also, daß trotz des rapiden Anstieges der Albumine unmittelbar nach der Durchspülung die Globuline allmählich so stark zunehmen, daß das Verhältnis der Albumine zu den Globulinen, das vor der Durchspülung bestanden hatte, nunmehr zugunsten der Globuline verschoben ist.

Bei Betrachtung der Befunde und beim Versuch einer theoretischen Deutung muß man sich jedenfalls vergegenwärtigen, daß auf kleinere Differenzen der Albumin- und Globulinmengen schon wegen der angewandten Methodik nicht viel zu geben ist, und daß normalerweise bei Hunden erhebliche Schwankungen des Eiweißquotienten vorkommen, deren Ursachen noch nicht klargestellt sind. Aus diesen Gründen ist man nur bei sehr konstant eintretenden oder sehr bedeutenden Ausschlägen in der Lage, allgemeiner gültige Schlüsse zu ziehen.

Ferner ist zu bedenken, daß man nicht die Wirkung eines Organes, sondern des Organismus auf die Blutzusammensetzung studiert und daß man daher bei den ungemein verwickelten Wechselbeziehungen der verschiedenen Organe in der theoretischen Deutung besondere Vorsicht walten lassen muß. Leider ist es mir bisher noch nicht möglich gewesen, die Veränderungen des Blutes nach Ausschaltung bestimmter Organe oder bei künstlicher Durchblutung eines Organes zu untersuchen, sodaß über den Ort der Bildung der Serumeiweißkörper nichts Bestimmtes ausgesagt werden kann.

Die am meisten in die Augen fallende und in unseren Versuchen überall deutlich ausgeprägte Erscheinung ist die starke Zunahme des Albumineiweißes unmittelbar nach dem Aderlaß. Diese Zunahme tritt so schnell ein und ist so erheblich — zuweilen betrug sie in 3 Stunden bis 30 Proz. — daß man schwerlich wird annehmen dürfen, daß der Organismus in dieser kurzen Zeit eine so große Menge albuminähnlicher Eiweißkörper aus dem Zelleiweiß oder aus den Globulinen des Plasmas gebildet haben kann. Letzteres ist deswegen nicht wahrscheinlich, weil die Globuline nicht abnehmen, sondern sich auf dem alten Bestande erhalten. Eine so schnelle und weitgehende Neubildung von Albuminen wird weiterhin noch dadurch unwahrscheinlich, daß die Zunahme nur die erste Zeit nach dem Aderlasse betrifft und dann nur

äußerst langsam, langsamer sogar als die der Globuline, sich geltend macht.

Aus diesen Gründen erscheint es weitaus wahrscheinlicher, die Ursache des Albuminanstieges in anderen Momenten zu suchen. Es könnte dabei erstens eine Verschiebung in dem Sinne in Betracht kommen, daß der Organismus dem Blute Wasser entzieht und auf diese Weise eine Albuminvermehrung vorgetäuscht wird. Das Fehlen aller Ödeme oder Exsudate würde nicht gegen diese Anschauung sprechen, wohl aber der Umstand, daß der Globulinanteil sich nicht vergrößert. Um letzteres zu erklären, müßte man neue und zwar nicht sehr wahrscheinliche Hilfshypothesen machen, etwa derart, daß die Globuline vom Organismus verbraucht würden, die Albumine nicht, wofür wir vorerst keine Anhaltspunkte haben.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit des so schnellen Albuminanstieges könnte man darin suchen, daß in der Gewebsflüssigkeit und Lymphe das leichter filtrierende Albumin in größeren Mengen vorhanden ist als das Globulin, und eine Differenz durch reichlichen Lymphzufluß entstehen kann. Zwei Bestimmungen der Albumine und Globuline der Lymphe aus dem Ductus thoracicus, die ich von dieser Erwägung ausgehend ausführte, ergaben jedoch keine Stütze für diese Anschauung.

Die Zahlenangaben mögen hier folgen:

1. Blutserum enthält 8,05 Proz. Eiweiß, davon
0,91 Proz. Euglobulin,
3,57 „ Gesamtglobulin,
4,48 „ Albumin.
Eiweißquotient = **1,25.**

Lymphserum desselben Hundes enthält Eiweiß 5,42.
0,57 Proz. Euglobulin,
2,11 „ Gesamtglobulin,
3,31 „ Albumin.
Eiweißquotient = **1,56.**

2. Blutplasma (Hirudin) eines Hundes enthält:
7,7 Proz. Eiweiß,
1,51 „ Euglobulin + Fibrinogen,
3,15 „ Gesamtglobulin,
4,55 „ Albumin.
Eiweißquotient = **1,44.**

Lymphplasma enthält:
6,02 Proz. Eiweiß,
1,19 „ Fibrinogen + Euglobulin,
2,4 „ Gesamtglobulin,
3,6 „ Albumin.
Eiweißquotient = **1,58.**

Die Zahlen für den Eiweißquotienten scheinen also in der Lymphe höher zu sein als im Blut, jedoch sind die Abweichungen nicht derart, daß man mit Sicherheit eine Bedeutung des Überwiegens der Albumine in der Lymphe für den schnellen Anstieg der Albumine nach dem Aderlaß als erwiesen ansehen könnte. Da jedoch die Lymphe des Ductus thoracicus im wesentlichen Darm-, nicht Gewebslymphe ist, wäre es möglich, daß sich in den Geweben das Verhältnis für die Albumine noch günstiger gestaltet.

Wie dem auch sei, jedenfalls scheint der Organismus die Fähigkeit zu haben, entweder in seinen Parenchymzellen oder in der Gewebsflüssigkeit Albumin zurückzuhalten, das, wenn nötig, schnell an die Zirkulation abgegeben werden kann.

Eine Bestätigung findet diese Anschauung in der Angabe von Henri und Mayer*), welche bei Durchspülung von Hunden mit Kochsalzlösung in den letzten Blutproben fast gar keine Globuline, wohl aber noch Albumine fanden.

In welchen Organen diese Aufspeicherung der Albumine stattfindet, ob, wie es wahrscheinlich ist, alle Organe entsprechend ihrer Masse dabei beteiligt sind, ob vornehmlich oder ausschließlich nur eines oder wenige, entzieht sich vorerst unserer Kenntnis. Künstliche Durchblutungsversuche verschiedener Organe könnten vielleicht über diese Frage Aufschluß geben.

Der langsam eintretende, sich über Tage erstreckende Anstieg der Globuline darf wohl unbedenklich als Neubildung desselben aufgefaßt werden. Anhaltspunkte für eine Bildung von Globulinen aus Albuminen, wie sie von Moll (loc. cit.) wahrscheinlich gemacht worden ist, haben sich nicht ergeben. Allerdings scheint in einigen Versuchen mit der Zunahme der Globuline eine geringe Abnahme der Albumine einherzugehen, doch sind die Differenzen zu gering, um bestimmte Vermutungen zuzulassen. Vielleicht gelingt es, dieser Frage mittels Durchspülung von Tieren mit sehr albuminreichen Blutkörperchenemulsionen näher zu treten.

Ob die neugebildeten Körper freilich wirklich genau das darstellen, was gewöhnlich als Albumin und Globulin bezeichnet wird, muß dahingestellt bleiben, da wir auf wenige relativ rohe Methoden zur Charakterisierung dieser Eiweißkörper angewiesen sind.

Inwieweit reichliche Fütterung von Einfluß auf den Wiederersatz der Eiweißkörper ist, wäre mit Hilfe der Durchspülungsmethode noch zu untersuchen. Es wäre möglich, daß gut gefütterte Hunde sich anders verhalten. (Allerdings dürfte es schwierig

*) Henri et Mayer, C. r. soc. de Biol. 28. Juin 1902.

sein, den Hunden nach der Durchspülung reichlich Nahrung zuzuführen.)

Die von mir benutzten Hunde waren vor dem Versuch gut gefüttert und hatten vielleicht nicht immer einen ganz leeren Darm. Auch das mag vielleicht von Bedeutung für den Ausfall der Versuche sein.

Als Resultat der letzten Erörterung ergibt sich also:

1. Der Albuminanstieg unmittelbar nach dem Aderlaß ist wahrscheinlich auf eine Retention oder Aufspeicherung des Albumins außerhalb des zirkulierenden Blutes zu beziehen.
2. Der Wiederersatz der Globuline verläuft beim hungernden Hund schneller als der der Albumine.

XI.

Das Verhalten von peptischen Verdauungsprodukten der Plasteine zu Leber, Dickdarm, Muskeln, Gehirn und anderen Organen.

Von Dr. **Joseph Grossmann.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.

Zweite Mitteilung.

Durch meine früheren Versuche*) habe ich die Fähigkeit der zerkleinerten Magen- und Dünndarmschleimhaut in Plasteinalbumosenlösungen koagulable Stoffe (Plasteine) zu bilden festgestellt.

Es war von Interesse, das Verhalten von peptischen Verdauungsprodukten der Plasteine auch zu den anderen Organen zu untersuchen. Im folgenden teile ich die Resultate von solchen Versuchen mit, die ich mit Leber, Dickdarm, Muskeln, Gehirn, Niere, Milz und Blut angestellt habe.

Außerdem habe ich, um die Einwirkung von Luftbakterien auszuschließen, noch vier Versuche mit Magen- und Dünndarmschleimhaut unter Chloroformzusatz ausgeführt.

Die Versuchsanordnung und die Methodik war im übrigen, wie früher.

Versuch XVII.

Leber.

Ein kleiner Hund wurde durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Die Leber wurde mit warmer 0,8proz. Kochsalzlösung gewaschen und zwischen Papier abgepreßt. Darauf wurde ein Leberstück gut zerkleinert, in drei annähernd gleiche Portionen geteilt, in gewogene Kolben eingebracht und gewogen. Eine Portion der Leber (A) wurde mit $^3/_4$ Volumen 1proz. Mononatriumphosphatlösung versetzt und am Rückflußkühler sofort 20 Minuten lang gekocht, die zweite (B) vor dem Aufkochen 3 Stunden bei 40° im Brutschrank gehalten, die dritte Probe (C) mit 20 ccm Albumosenlösung aus Fibrinplastein versetzt und für 3 Stunden in den Brutschrank gestellt.

---

*) Diese Beiträge 6, 192.

Alle Stickstoffbestimmungen wurden doppelt ausgeführt.

Portion A (sofort analysiert). a = 17,41 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 5,2 ccm; g = 55,9 ccm. Somit auf 20,97 g (Gewicht des Leberbreies im Kolben C) berechnet = 67,3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Portion B (nach dem Verweilen im Brutschrank). a, = 18,04 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 6 ccm; g, = 64,5 ccm oder auf 20,97 g Leber berechnet = 74,9 ccm.

Portion C (im Brutschrank mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung digeriert). a„ = 20,97 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 29,7 ccm; g„ = 319, 275 ccm. Den zugesetzten 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 287,6 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Auf Grund der bei A und B erhaltenen Zahlen muß man schließen, daß die zerkleinerte Leber beim dreistündigen Verweilen im Brutschrank der Autolyse unterlag, denn die Menge nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht in B = 74,9 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, gegen 67,3 ccm in A.

Wenn man annimmt, daß die Autolyse in C ebenso weit vorgeschritten war, wie in B, so hätte man, wenn keine Rückverwandlung der zugesetzten Plasteinalbumosen in koagulable Stoffe durch die Leber stattgefunden hätte, mindestens einen Verbrauch von 74,9 + 287,6 = 362,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure finden müssen. In der Tat haben wir nur 319,275 ccm verbraucht. Es fehlen also 43,225 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, oder 15,02 Proz. der ganzen mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse noch Rückverwandlung vorgelegen hat, war auf einen Verbrauch von 67,3 + 287,6 = 354,9 ccm $^{n}/_{10}$-Säure zu rechnen. Es fehlen dann immer noch 35,625 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Versuch XVIII.

Leber.

Mittelgroßer Hund, durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Ein Leberstück entnommen, gut zerkleinert und in drei Teile geteilt. Die übrige Bearbeitung wie im früheren Versuch. Die Portionen B und C 3 Stunden bei 40°.

A. a = 29,93 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 7,1 ccm; g = 76,325 ccm, oder auf 24,84 g (Gewicht des Leberbreies C) berechnet = 63,3 ccm.

B. a, = 26,36 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 7,7 ccm; g, = 82,775 ccm, oder auf 24,84 g berechnet = 78 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 24,84 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 19,5 ccm; g„ = 209,625 ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 215,7 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs durch Autolyse (B—A) entspricht 14,7 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 293,7 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 209,625 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Verlust = 84,075 ccm $^{n}|_{10}$-Säure, d. h. 38,97 Proz. des mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Aber auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse noch Rückverwandlung vorgelegen hat, fehlen immer noch 69,375 ccm $^{n}|_{10}$-Säure.

Versuch XIX.

Dickdarm.

Von dem in Versuch XVII verwendeten Hunde wurde sofort nach dem Tode ein Dickdarmstück entnommen, eröffnet, durch Auspressen zwischen den Fingern und Waschen gereinigt, gut zerkleinert und in drei Teile geteilt. Das Verweilen der Portionen B und C im Brutschrank dauerte nur 2 Stunden. Bearbeitung wie in den früheren Versuchen.

A. a = 22,35 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 5,7 ccm; g = 71,25 ccm, oder auf 22,03 g (Gewicht des Darmstückes im Kolben C) berechnet = 70,2 ccm.

B. a, = 22,77 g; b, = 250 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f = 7,5 ccm; g, = 93,75 ccm, oder auf 22,03 g berechnet = 90,7 ccm.

C. (Portion, die mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung versetzt war) a„ = 22,03 g; b„ = 250 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 15,6 ccm; g„ = 195 ccm. Den zugesetzten 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 169,6 ccm $^n/_{10}$-Säure. Die Zunahme durch Autolyse in B entspricht 20,5 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 260,3 ccm $^n/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 195 ccm $^n/_{10}$-Säure. Es fehlen also 65,3 ccm $^n/_{10}$-Säure, oder 38,5 Proz. des mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse, noch Rückverwandlung vorgelegen hat, fehlen immer noch 44,8 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Versuch XX.

Dickdarm.

Von dem in Versuch XVIII verwendeten Hunde wurde sofort nach dem Tode ein Dickdarmstück entnommen, auf das gründlichste gereinigt, gut zerkleinert und in drei Teile geteilt. Die übrige Bearbeitung geschah wie in Versuch XIX. Das Verweilen der Portionen B und C im Brutschrank dauerte $2^1/_2$ Stunden.

Für diesen Versuch benutzte ich eine aus Kaseoplastein dargestellte Plasteinalbumosenlösung.

A. a = 19,65 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 3 ccm; g = 37,5 ccm, oder auf 17,88 g (Gewicht des Darmstückes im Kolben C) berechnet = 34,1 ccm.

B. a, = 18,17 g; b, = 250 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 5,8 ccm; g, = 72,5 ccm, oder auf 17,88 g berechnet = 71,3 ccm.

C. a„ = 17,88 g; b„ = 250 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 14 ccm; g„ = 175 ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 160,8 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Die Resultate von A und B zeigen, daß das zerkleinerte Darmstück beim $2^1/_2$stündigen Verweilen im Brutschrank in ausgesprochener Weise der Autolyse unterlag, denn die Menge nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht in B = 71,3 ccm $^n/_{10}$-Säure, gegen nur 34,1 ccm in A.

Erwarteter Verbrauch mindestens 232,1 ccm $^n/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 175 ccm. Es fehlen also 57,1 ccm $^n/_{10}$-Säure, oder 35,5 Proz. der ganzen mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Aber auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse, noch Rückverwandlung vorgelegen hat, fehlen immer noch 19,9 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Versuch XXI.

Muskel.

Großer Hund; durch Verblutenlassen getötet. Vom Oberschenkel sofort nach dem Tode ein Muskelstück entnommen. Bearbeitung wie früher. Digestionsdauer der Proben B und C 3 Stunden. Die Plasteinalbumosenlösung war aus Fibrinplastein dargestellt.

A. a = 34,89 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 10,1 ccm; g = 108,575 ccm, oder auf 38,37 g (Gewicht des Muskelstückes C) berechnet = 119,4 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

B. a, = 35,37 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 10,8 ccm; g, = 116,1 ccm, oder auf 38,37 g berechnet = 125,9 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 38,37 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 20,2 ccm; g„ = 217,15 ccm. Den zugefügten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 127,2 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die autolytische Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs in B gegen A entspricht = 17,325 ccm.

Erwarteter Verbrauch 253,1 ccm. Tatsächlich gefunden: 217,15 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Es fehlen also 35,95 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, d. h. 28,2 Proz. des mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Auch wenn man annimmt, daß weder Autolyse, noch Rückverwandlung stattgefunden hat, ergibt sich immer noch ein Fehlbetrag von 18,625 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Versuch XXII.

Muskel.

Mittelgroßer Hund; durch Verblutenlassen getötet; im Gebiete des Schenkels ein Muskelstück entnommen. Die Proben B und C bleiben im Brutschrank 3 Stunden. Bearbeitung wie früher. Plasteinalbumosenlösung aus Fibrinplastein.

A. a = 50,52 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 14 ccm; g = 150,5 ccm, oder auf 48,4 g (Gewicht des Muskelstückes C) berechnet = 144,1 ccm.

B. a, = 50,13 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 15 ccm; g, = 161,25 ccm, oder auf 48,4 g berechnet = 155,6 ccm.

C (+ 20 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 48,4 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 53 ccm; g„ = 569,75 ccm. Den 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 474,4 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die Steigerung der Menge des nichtkoagulablen Stickstoffs bei dreistündiger Autolyse entspricht also 11,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 630 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 569,75 ccm $^{n}/_{10}$-Säure; es fehlen also 60,25 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, oder 12,7 Proz. des mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Auch wenn man annimmt, daß weder Autolyse noch Rückverwandlung stattgefunden hat, würden immer noch 48,75 ccm $^{n}/_{10}$-Säure fehlen.

Versuch XXIII.

Gehirn.

Von dem in Versuch XXI verwendeten Hunde wurde sofort nach dem Tode das Großhirn entnommen, gereinigt, gut zerkleinert und in drei Teile geteilt. Bearbeitung wie in den früheren Versuchen. Die Proben B und C

bleiben im Brutschrank 3 Stunden. Die Plasteinalbumosenlösung aus Fibrinplastein dargestellt.

A. a = 19,04 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 3,4 ccm; g = 42,5 ccm, oder auf 20,64 g (Gewicht des Großhirnstückes C) berechnet = 46,07 ccm.

B. a, = 20,4 g; b, = 250 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 4,6 ccm; g, = 57,5 ccm, oder auf 20,64 g berechnet = 58,1 ccm.

C (+ 20 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 20,64 ccm; b„ = 250 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 39,8 ccm; g„ = 497,5 ccm. Den zugesetzten 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 474,4 ccm n/10 - Säure. Die autolytische Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht 58,1 ccm n/10-Säure in B gegen 46,07 ccm in A.

Erwarteter Verbrauch 519,9 ccm n/10-Säure. Tatsächlich verbraucht nur 497,5 ccm n/10-Säure; es fehlen also 35 ccm n/10-Säure oder 7,3 Proz. des mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Unter der Annahme, daß weder Autolyse noch Rückverwandlung stattgefunden hat, ergibt sich immer noch ein Fehlbetrag von 22,97 ccm n/10-Säure.

Versuch XXIV.

Gehirn.

Dem in Versuch XXII verwendeten Hunde wird sofort nach dem Tode das Großhirn entnommen. Bearbeitung wie früher. Die Proben B und C bleiben im Brutschrank $3^1/_2$ Stunden. Die Plasteinalbumosenlösung aus Kaseoplastein dargestellt.

A. a = 21,49 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 2,4 ccm; g = 25,8 ccm, oder auf 21,6 g (Gewicht des Gehirnstückes C) berechnet = 25,9 ccm.

B. a, = 21,42 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 3,5 ccm; g, = 37,625 ccm, oder auf 21,6 g berechnet = 37,9 ccm.

C (+ 15 ccm Kaseoplasteinalbumosenlösung). a„ = 21,6 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ 16,2 ccm; g„ = 174,15 ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 160,8 ccm n/10-Säure. Die autolytische Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs in B gegen A entspricht 12 ccm n/10-Säure.

Erwarteter Verbrauch 198,7 ccm n/10-Säure. Tatsächlich verbraucht nur 174,15 ccm. Es fehlen also 24,55 ccm n/10-Säure, oder 15,2 Proz. des mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Auch wenn man annimmt, daß weder Autolyse noch Rückverwandlung eingetreten wäre, ergibt sich immer noch ein Fehlbetrag von 12,55 ccm n/10-Säure.

Versuch XXV.

Niere.

Großer Hund durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Beide Nieren sofort entnommen, von der Kapsel befreit, gut zerkleinert und in 3 Teile geteilt. Die übrige Bearbeitung wie in den früheren Versuchen. Das Verweilen der Portionen B und C im Brutschrank dauerte 3 Stunden. Die Plasteinalbumosenlösung war aus Eieralbuminplastein dargestellt.

A. a = 12,45 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 2,8 ccm; g = 35 ccm, oder auf 12,98 g (Gewicht des Nierenbreies C) berechnet = 36,4 ccm.

B. $a_{,} = 12{,}97$ g; $b_{,} = 250$ ccm; $c_{,} = 120$ ccm; $d_{,} = 180$ ccm; $e_{,} = 30$ ccm; $f_{,} = 4$ ccm; $g_{,} = 50$ ccm, oder auf 12,98 g berechnet = 50,03 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). $a_{,,} = 12{,}98$ g; $b_{,,} = 250$ ccm; $c_{,,} = 120$ ccm; $d_{,,} = 180$ ccm; $e_{,,} = 30$ ccm; $f_{,,} = 15$ ccm; $g_{,,} = 187{,}5$ ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 213 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs durch Autolyse (B—A) entspricht 13,63 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 263,03 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 187,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Verlust = 75,53 ccm $^{n}/_{10}$-Säure oder 35,4 Proz. des mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Aber auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse noch Rückverwandlung vorgelegen hat, fehlen immer noch 61,9 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Versuch XXVI.

Milz.

Von dem in Versuch XXV verwendeten Hund wurde sofort nach dem Tode die Milz entnommen, gut zerkleinert und in 3 Teile geteilt. Bearbeitung wie in dem früheren Versuch. Die Portionen B und C drei Stunden bei 40°.

Die Plasteinalbumosenlösung aus Eieralbuminplastein dargestellt.

A. a = 4,49 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 2 ccm; g = 21,5 ccm, oder auf 3,9 g (Gewicht des Milzstückes C) berechnet = 18,65 ccm.

B. $a_{,} = 4{,}32$ g; $b_{,} = 215$ ccm; $c_{,} = 120$ ccm; $d_{,} = 180$ ccm; $e_{,} = 30$ ccm; $f_{,} = 3$ ccm; $g_{,} = 32{,}25$ ccm, oder auf 3,9 g berechnet = 29,1 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). $a_{,,} = 3{,}9$ g; $b_{,,} = 215$ ccm; $c_{,,} = 120$ ccm; $d_{,,} = 180$ ccm; $e_{,,} = 30$ ccm; $f_{,,} = 20$ ccm; $g_{,,} = 215$ ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 213 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die Zunahme des nichtkoagulablen Stickstoffs durch Autolyse (B—A) entspricht 10,45 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 242,1 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 215 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Es fehlen also 27,1 ccm $^{n}/_{10}$-Säure oder 12,7 Proz. der ganzen mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Auch wenn man annimmt, daß in C weder Autolyse noch Rückverwandlung vorgelegen hat, fehlen immer noch 16,65 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Versuch XXVII.

Blut.

Dem durch Verblutenlassen getöteten Pferde wurde eine gewisse Menge Blut entnommen. Nach 24stündigem Stehen im Schnee wurde das klare gelbe Serum abgegossen und in drei gleiche Teile geteilt. Bearbeitung wie früher. Die Proben B und C bleiben im Brutschrank 3 Stunden. Die Plasteinalbumosenlösung war aus Kaseoplastein dargestellt.

A. a = 30 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 2 ccm; g = 21,5 ccm.

B. $a_{,} = 30$ g; $b_{,} = 215$ ccm; $c_{,} = 120$ ccm; $d_{,} = 180$ ccm; $e_{,} = 30$ ccm; $f_{,} = 2$ ccm; $g_{,} = 21{,}5$ ccm.

C (+ 15 ccm Kaseoplasteinalbumosenlösung). $a_{,,} = 30$ g; $b_{,,} = 215$ ccm $c_{,,} = 120$ ccm; $d_{,,} = 180$ ccm; $e_{,,} = 30$ ccm; $f_{,,} = 13$ ccm; $g_{,,} = 139{,}75$ ccm. Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 129 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Autolyse fehlt, denn die Menge nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht in B 21,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, ebenso wie in A.

Erwarteter Verbrauch 150,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure, Tatsächlich verbraucht 139,75 ccm. Es fehlen also 10,75 ccm $^{n}/_{10}$-Säure oder 8,3 Proz. der ganzen mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Versuch XXVIII.

Magen (Chloroformzusatz).

Mittelgroßer Hund durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Magen mit unverdauten Fleischstücken gefüllt. Schleimhautbrei reagiert sauer. Bearbeitung wie in den früheren Versuchen. Digestionsdauer von B und C 3 Stunden. Der Inhalt der gut verschlossenen Kolben B und C wurde mit einigen Tropfen Chloroform versetzt. Plasteinalbumosenlösung aus Fibrinplastein.

A. a = 18,29 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 4,8 ccm; g = 51,6 ccm, oder auf 18,55 g (Gewicht des Magenschleimhautbreies C) berechnet = 52,3 ccm.

B. a, = 21,92 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 6 ccm; g, = 64 ccm, oder auf 18,55 g berechnet = 54,5 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 18,55 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 15,5 ccm; g„ = 166,625 ccm.

Dem Stickstoff der zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 135,3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die Zunahme durch Autolyse in B entspricht nur 2,2 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch mindestens 189,8 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 166,625 ccm. Es fehlen also 23,175 ccm $^{n}/_{10}$-Säure oder 17,1 Proz. der ganzen mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Versuch XXIX.

Dünndarm (Chloroformzusatz).

Dem in Versuch XXVIII verwendeten Hunde wurde sofort nach dem Tode ein Dünndarmstück (Jejunum) entnommen. Weitere Behandlung wie in dem früheren Versuch. Digestionsdauer von B und C 2 Stunden. Plasteinalbumosenlösung aus Fibrinplastein.

A. a = 24,95 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 4,8 ccm; g = 60 ccm, oder auf 24,08 g (Gewicht des Darmstückes C) berechnet = 57,09 ccm.

B. a, = 22,37 g; b, = 250 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 4,6 ccm; g, = 57 ccm, oder auf 24,08 g berechnet = 61,3 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 24,08 g; b„ = 250 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 14 ccm; g„ = 175 ccm.

Den zugesetzten 15 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 135,3 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Die autolytische Vermehrung des nichtkoagulablen Stickstoffs ist unbedeutend, sie entspricht 4,21 ccm $^{n}/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 196,6 ccm $^{n}/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 175 ccm. Es fehlen also 21,6 ccm $^{n}/_{10}$-Säure oder 16 Proz. des mit 15 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Versuch XXX.

Magen (Chloroformzusatz).

Großer Hund durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Der Magen fast leer. Bearbeitung wie früher. Die Portionen B und C

$4^1/_2$ Stunden bei 40°. Plasteinalbumosenlösung aus Kaseoplastein dargestellt.

A. a = 13,09 g; b = 215 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 4,2 ccm; g = 45,15 ccm, oder auf 12,25 g (Gewicht des Magenschleimhautbreies C) berechnet = 42,2 ccm.

B. a, = 12,57 g; b, = 215 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm, f, = 4,1 ccm; g, = 44,075 ccm, oder auf 12,25 g berechnet = 42,9 ccm.

C (+ 15 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 12,25 g; b„ = 215 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 20 ccm; g„ = 215 ccm.

Dem Stickstoff der zugesetzten 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 216 ccm $^n/_{10}$-Säure. Auf Grund der bei A und B erhaltenen Zahlen muß man schließen, daß die zerkleinerte Magenschleimhaut beim $4^1/_2$stündigen Verweilen im Brutschrank fast keiner Autolyse unterlag, denn die Menge nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht in B = 42,9 ccm $^n/_{10}$-Säure und in A = 42,2 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 258,9 ccm $^n/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 215 ccm $^n/_{10}$-Säure. Differenz: 43,9 ccm $^n/_{10}$-Säure = 20,3 Proz. des mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffs.

Versuch XXXI.

Dünndarm (Chloroformzusatz)

Dem in Versuch XXX verwendeten Hunde wurde sofort nach dem Tode ein Dünndarmstück (Jejunum) entnommen. Weitere Behandlung wie früher. Digestionsdauer von B und C $3^1/_2$ Stunden. Plasteinalbumosenlösung aus Kaseoplastein.

A. a = 15,25 g; b = 250 ccm; c = 120 ccm; d = 180 ccm; e = 30 ccm; f = 4,1 ccm; g = 51,25 ccm, oder auf 15,94 g (Gewicht des Darmstückes C) berechnet = 53,5 ccm.

B. a, = 14,13 g; b, = 250 ccm; c, = 120 ccm; d, = 180 ccm; e, = 30 ccm; f, = 3,8 ccm; g, = 47,5 ccm, oder auf 15,94 g berechnet = 53,5 ccm.

C (+ 20 ccm Plasteinalbumosenlösung). a„ = 15,94 g; b„ = 250 ccm; c„ = 120 ccm; d„ = 180 ccm; e„ = 30 ccm; f„ = 17,5 ccm; g„ = 218,75 ccm.

Den zugesetzten 20 ccm Plasteinalbumosenlösung entsprechen 216 ccm $^n/_{10}$-Säure. Beim $3^1/_2$ stündigen Verweilen im Brutschrank keine autolytische Vermehrung des nichtkoagulablen Stickstoffs, denn die Menge des nichtkoagulablen Stickstoffs entspricht in B wie in A 53,5 ccm $^n/_{10}$-Säure.

Erwarteter Verbrauch 269,5 ccm $^n/_{10}$-Säure. Tatsächlich verbraucht 218,75 ccm $^n/_{10}$-Säure

Es fehlen also 50,75 ccm $^n/_{10}$-Säure oder 23,4 Proz. der ganzen mit 20 ccm Plasteinalbumosenlösung zugesetzten Stickstoffmenge.

Schlußbemerkungen.

Auf Grund der in meinen beiden Mitteilungen angeführten Versuchsergebnisse kann man den Schluß ziehen, daß sowohl die frische zerkleinerte Magen- und Dünndarmschleimhaut, wie auch viele andere Organe des Hundes, die Fähigkeit besitzen, bei 2- bis 3-stündigem Verweilen im Brutschrank in genügend konzentrierten Plasteinalbumosenlösungen koagulable Stoffe (aller Wahrscheinlichkeit nach Plasteine) zu bilden.

Was das Verhalten des Blutserums (vom Pferde) zu Plasteinalbumosenlösung anlangt, so verfüge ich leider nur über einen einzigen Versuch, dessen Ergebnis kein entscheidendes ist.

Daneben machte ich einige Versuche an Hunden, um das Verhalten der Plasteinalbumosen bei subkutaner Einspritzung aufzuklären. Im Hundeharn konnte man 1 bis 2 Tage nach der Einspritzung die Anwesenheit von Albumosen ohne Schwierigkeit konstatieren. Aber die genaue Ermittlung der Quantität der mit dem Harn ausgeschiedenen und eventuell im Körper zurückgebliebenen Albumosen war leider unmöglich, weil der mit Zinksulfat ausgesalzene Albumosenniederschlag starke Beimischung von Farbstoff zeigte und vielleicht noch andere stickstoffhaltige Substanzen enthielt. Bei der subkutanen Einspritzung von in 0,5 proz. Soda gelösten Plasteinen (etwa 1,0 g) konnte ich bei mehrtägiger Untersuchung des Harns in Übereinstimmung mit Sawjalow*), der den Hunden Plasteine intravenös einverleibte, keine Spur davon im Harn nachweisen.

Ob wirklich in der Schleimhaut des Verdauungstraktes unter normalen Verdauungsbedingungen die Bildung von Plasteinen oder überhaupt von koagulablem Eiweiß aus den aufgenommenen eiweißartigen Verdauungsprodukten stattfindet? Die Magenversuche von K. Gläßner**) beantworten diese Frage in betreff der Bildung von koagulablem Eiweiß aus Albumosen bejahend; leider habe ich in zwei von mir nach Gläßner angestellten Versuchen dies Resultat nicht bestätigen können. In den Versuchshälften der Magenschleimhaut fand ich nach 3stündigem Verweilen im Brutschrank immer einen nicht unbeträchtlichen Zuwachs von unkoagulablem Stickstoff.

Jedenfalls sind für die endgültige Lösung der wichtigen Frage über die Bildung von Plasteinen in der Schleimhaut des Verdauungstraktus oder überhaupt von koagulablem Eiweiß aus Albumosen weitere spezielle Untersuchungen notwendig.

Das Vorhandensein von Plasteinen im Mageninhalt bei der Verdauung hat schon Okunew***) bei Tieren nachgewiesen und neuerdings E. Tedeschi†) beim Menschen wahrscheinlich gemacht.

---

*) Sawjalow, Zur Theorie der peptischen Verdauung. Dissert. Jurieff. 1899 (russisch).

) K. Gläßner, Diese Beiträge **1, 328.

***) Okunew, Beiträge zur Biologie des Chymosins. Botkins Krankenhauszeitung 1901 (russisch).

†) E. Tedeschi, Biochemisches Centralblatt **3**, Nr. 19/20.

Es wäre wohl viel wichtiger, wenn man das Vorhandensein von Plasteinen in der Schleimhaut des Verdauungstraktes selbst oder im Blut und anderen Organen während der Verdauung nachweisen könnte. Aus dem Gesagten folgt, daß die physiologische Rolle der Plasteine im tierischen Organismus bis jetzt durchaus dunkel ist. Auch steht die wichtige Frage über den Chemismus der Bildung von Plasteinen im Gemisch von peptischen Eiweißverdauungsprodukten ganz offen. Wird letztere Frage im Sinne der Synthese (Kondensation, Polymerisation usw.) entschieden, so werden die bisher gefundenen Tatsachen viel an Interesse gewinnen.

Meine Untersuchungen bringen neues tatsächliches Material in der Richtung, daß sie die Fähigkeit sowohl der Magen- und Darmschleimhaut, wie auch der anderen Organe beweisen, in Plasteinalbumosenlösungen unter gewissen Bedingungen koagulable Stoffe (bzw. Plasteine) zu bilden und daß sie denselben Prozeß auch für die normale Verdauung wahrscheinlich machen.

XII.

Beiträge zur Kenntnis der Autolyse.

Von **O. Schumm.**

Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.

I. Über die bei der Autolyse der leukämischen Milz entstehenden Spaltungsprodukte.*)

Versuchsergebnisse.

Vor längerer Zeit habe ich Beobachtungen mitgeteilt[1]), die sich auf die bei der Autolyse der leukämischen Milz stattfindenden Umsetzungen beziehen und die beweisen, daß unter gleichzeitiger starker Abnahme des Gehalts an albumosenartigen Stoffen Lysin, Leucin, Tyrosin und Ammoniak entstehen.

Bei Fortführung der Untersuchung unter Anwendung einer größeren Menge Material ist es möglich gewesen, noch weitere Spaltungsprodukte der Eiweißkörper und auch solche der Nucleine zu isolieren.

Im Hauptversuch wurden 1605 g Milz (die von zwei Fällen von lienal-myelogener Leukämie stammten) einer drei Monate dauernden antiseptischen Autolyse unterworfen. In der von Eiweiß befreiten Verdauungsflüssigkeit wurde zunächst die Stickstoffverteilung nach bekannten Methoden[2]) untersucht und zwar mit folgendem Ergebnis:

Von 100 Teilen Gesamtstickstoff entfielen auf:

den Phosphorwolframsäureniederschlag	28,54	Teile
das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag .	71,46	„
den nach Schöndorff[3]) spaltbaren Anteil des Filtrats vom Phosphorwolframsäureniederschlag . . .	24,11	„

---

*) Bezüglich der Literatur über Autolyse der Organe verweise ich auf die zusammenfassende Darstellung von Jakoby „Über die Bedeutung der intracellulären Fermente für die Physiologie und Pathologie“ in „Ergebnisse der Physiologie“ 1, 1, 213.

den nach Schöndorff nicht spaltbaren Anteil des
Filtrats vom Phosphorwolframsäureniederschlag 47,35 Teile
Ammoniak . . . . 5,54 „

Hier erscheint beachtenswert, daß nicht weniger als 24 Proz. des Gesamtstickstoffs, d. i. ein Drittel vom Stickstoff der Aminosäurenfraktion auf solche Stoffe entfällt, die durch Erhitzen mit konzentrierter Phosphorsäure auf 150° ihren Stickstoff als Ammoniak abspalten.

Die Hauptmenge der enteiweißten Verdauungsflüssigkeit, enthaltend 32 g Stickstoff, wurde unter Anwendung der im wesentlichen von Kossel und Kutscher[4]), von Fischer[5]), sowie Krüger und Salomon[6]) ausgearbeiteten Methoden aufgeteilt. Dabei wurden folgende Stoffe isoliert und identifiziert:

In der Fraktion der Alloxurkörper: Guanin, Xanthin, Hypoxanthin.

In der Histidinfraktion: Histidin.

In der Lysinfraktion: Lysin.

In der Fraktion der Aminosäuren: r-Alanin, l-Leucin, l-Tyrosin, Thymin, Paramilchsäure.

Quantitativ bestimmt wurde ferner Ammoniak, annähernd quantitativ Tyrosin, dessen Menge 5,2 g betrug.

Die Ausbeute an Purinbasen betrug für Guanin 0,2 g, Xanthin 0,25 g, Hypoxanthin 0,5 g.

Bei einem zweiten Versuch lieferte die aus 420 g leukämischer Milz (lienal-myelogene Form) nach 21tägiger Autolyse erhaltene Verdauungsflüssigkeit bei einem Stickstoffgehalt von 9,39 g unter Anwendung der gleichen Methoden an Purinbasen 0,10 g Guanin und 0,55 g Hypoxanthin.

Das vollständige Fehlen von Adenin in beiden Versuchen spricht für das regelmäßige Vorkommen eines auf Adenin desamidierend einwirkenden Ferments [Adenase nach Jones[7])].

Auffallend ist der große Unterschied in der Gesamtausbeute an Purinbasen:

Erster Versuch: Bei 32 g Gesamtstickstoff 0,95 g Purinbasen.

Zweiter Versuch: Bei 9,4 g Gesamtstickstoff 0,65 g Purinbasen.

Eine zuverlässige Erklärung für die verschiedene Ausbeute läßt sich nicht geben, da einerseits die Zusammensetzung des Ausgangsmaterials nicht bekannt ist, andererseits die bei der Autolyse der Organe sich abspielenden Vorgänge noch nicht völlig geklärt sind.

Tyrosin wurde im zweiten Versuch in einer Menge von 1,3 g isoliert, somit in der gleichen relativen Menge wie im Haupt-

versuch. Das scheint mir darauf hinzudeuten, daß bei der Autolyse der leukämischen Milz eine Zersetzung des einmal gebildeten Tyrosins nicht stattfindet; wenigstens hat die Vorstellung, daß in den beiden Versuchen trotz verschiedener Dauer der Autolyse die genau gleichen relativen Mengen Tyrosin einer Weiterzersetzung entgangen, gleiche relative Mengen aber gespalten wären, etwas Gezwungenes. Der vorliegende Befund scheint mir vielmehr dafür zu sprechen, daß eine Zersetzung des Tyrosins, wie sie z. B. von Emerson*) bei der Pankreasverdauung nachgewiesen worden ist, in der leukämischen Milz nicht stattfindet.

Es ist nun von Interesse, daß Kutscher[8]) bei der Autolyse der Thymusdrüse Tyrosin überhaupt nicht aufgefunden hat.

Kutschers Versuchsanordnung war freilich insofern eine etwas andere, als die zerhackten Drüsen erst 24 Stunden mit Wasser ausgezogen und nun die kolierten Auszüge der Autolyse unterworfen wurden. Ob man aber das Fehlen des Tyrosins im genannten Versuche dadurch erklären darf, daß man annimmt, es seien solche Eiweißstoffe, die tyrosinbildende Gruppen enthalten, in dem von Kutscher benutzten Wasserauszug von 500 g Thymusdrüsen überhaupt nicht vorhanden gewesen, ist doch recht fraglich. Somit scheint zwischen den bei der Autolyse der Thymusdrüse einerseits, der leukämischen Milz andererseits sich abspielenden fermentativen Vorgängen ein wesentlicher Unterschied zu bestehen.

Wie ich im folgenden Abschnitt näher ausführen werde, bildet sich Tyrosin sehr wahrscheinlich auch bei der Autolyse des leukämischen Knochenmarks.

Die Ausbeute an Lysin ist in den beiden Versuchen wieder eine sehr verschiedene. Denn während im Hauptversuch bei einem Gesamtstickstoffgehalt der Verdauungsflüssigkeit von 32 g nur 1,2 g Lysinpikrat erhalten wurden, lieferte im zweiten Versuch die aus 420 g Milz gewonnene, 9,4 g Stickstoff enthaltende Flüssigkeit 1,4 g Lysinpikrat, und endlich waren in einem früheren Versuche aus nur 400 g Milz etwas über 2 g Lysinpikrat erhalten worden. Die naheliegende Vermutung, daß im Hauptversuch zunächst gebildetes Lysin eine nachträgliche Umwandlung erfahren habe, entbehrt indes bislang der Bestätigung, insofern es mir nicht gelungen ist, das von Ellinger[9]) als Umwandlungsprodukt des Lysins nachgewiesene Pentamethylendiamin (Cadaverin) aufzufinden.

Die Ausbeute an Histidin betrug im Hauptversuch 0,83 g (1,5 Histidindinitrat), während im zweiten Versuch die anscheinend

*) Bildung von Oxyphenyläthylamin durch Abspaltung von CO_2.

vorhandene geringe Menge sich nicht in eine zur Identifizierung geeignete Form bringen ließ.

Die Ausbeute an Thymin betrug im Hauptversuch 0,15 g. Im zweiten Versuch wurde an derselben Stelle eine sehr kleine Menge in heißem Wasser leicht, in kaltem Wasser schwer löslicher Kristalle erhalten, die beim Erhitzen wie Thymin sublimierten und sich auch gegen Silbernitrat und Ammoniak wie Thymin verhielten.

Bei den übrigen Produkten kann ich Angaben über ihre Menge nicht machen. Paramilchsäure wurde sowohl im Hauptversuch wie auch im zweiten Versuch nachgewiesen.

Der Versuch, Arginin nachzuweisen, war wiederum vergeblich, ebenso wie bei einer früheren Untersuchung.

Dieser Befund ließe sich in befriedigender Weise dadurch erklären, daß man das Vorhandensein des von Kossel[10]) entdeckten Arginin spaltenden Ferments in der leukämischen Milz annähme. Indes wird man, ehe nicht der betreffende direkte Beweis geliefert worden ist, immerhin mit der Möglichkeit rechnen müssen, daß das Arginin in der durch Autolyse der leukämischen Milz entstandenen Verdauungsflüssigkeit vorhanden, seine Isolierung aber infolge der Anwesenheit störender Substanzen außerordentlich erschwert ist.

Bei der Untersuchung der Aminosäurenfraktion nach den von Fischer und seinen Schülern ausgearbeiteten Methoden ergaben sich Anzeichen für das Vorhandensein noch anderer als der oben angeführten Aminosäuren; ihre Isolierung steht indessen noch aus.

Im zweiten Versuch wurde ein Teil der frischen (6 Stunden alten) Milz auf Eiweißspaltungsprodukte untersucht und festgestellt, daß albumoseartige Substanzen sehr reichlich vorhanden waren; dagegen gelang es nicht, Tyrosin, Leucin oder andere einheitliche Spaltungsprodukte zu isolieren. Daß Tyrosin und Leucin in kleiner Menge vorhanden waren, konnte einerseits durch mikroskopische Untersuchung („Leucinkugeln"), andererseits durch den starken Ausfall der Millonschen Reaktion bei der von Albumosen befreiten Flüssigkeit wahrscheinlich gemacht werden.

Versuchsprotokoll.

Hauptversuch.

a) Lienal-myelogene Leukämie. Mann, 50 Jahre. Tod am 17. III. 04. Das kurz nach dem Tode aus dem Herzen entnommene Blut enthielt proteolytisches Ferment, Albumosen waren da noch nicht in nachweisbarer Menge vorhanden. Die Hälfte der Milz stand mir zur Verfügung. Nach dem Abwaschen mit heißem Wasser wurde sie fein zerhackt. 585 g Milzbrei wurden mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser,

15 ccm Chloroform[11]) und 25 ccm Toluol in einer gut verschließbaren Flasche*) stark durchgeschüttelt und bis zum nächsten Tage im Zimmer stehen gelassen. Dann wurde die steril befundene Masse 3 Monate lang bei 37° der Autolyse überlassen. Nachdem am Ende der Digestion die Sterilität festgestellt war, wurde die Flüssigkeit aufgekocht, filtriert und der Filterrückstand mit heißem Wasser ausgewaschen**). Die enteiweißte Flüssigkeit wurde auf 2340 ccm aufgefüllt und mit 25 ccm Chloroform versetzt. (4 ccm Flüssigkeit = 1 g Milz) 100 ccm enthielten 0,6048 g Stickstoff. Zur Aufarbeitung gelangten 2300 ccm (= 13,9 g N).

b) Lienal-myelogene Leukämie. Mann, Tod am 20. XII. 03. Sektion 12 Stunden nach dem Tode. Ein größeres Stück Milz wurde wie oben verarbeitet. 918 g Milzbrei wurden mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser, 40 ccm Chloroform und 60 ccm Toluol gemischt und bis zum nächsten Tage im Zimmer stehen gelassen. Dann wurde die steril befundene Masse 3 Monate lang bei 37° der Autolyse überlassen. Nachdem die Sterilität festgestellt war, wurde die Masse wie oben enteiweißt, die enteiweißte Flüssigkeit auf 3640 ccm aufgefüllt und mit 32 ccm Chloroform versetzt. In 100 ccm Flüssigkeit = 0,5768 g N. 3560 ccm der Flüssigkeit (= 20,5 g N) wurden nun mit den von der ersten Milz herrührenden 2300 ccm Flüssigkeit (= 13,9 g N) gemischt, 100 ccm für andere Versuche abgenommen, der Rest auf etwa 5 Liter eingedampft und heiß filtriert. Das Filtrat gab die Tryptophanreaktion. Beim Sättigen mit Ammoniumsulfat entstand eine ziemlich erhebliche Ausscheidung.

Analysen.

1. Je 5 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 24 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 24 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,0336 g N.

2. 50 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37 bis 41° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks[12]) 13,29 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,0186 g Ammoniakstickstoff.

3. 20 ccm mit 45 ccm Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung gefällt; der Niederschlag abfiltriert, mit 5 proz. Schwefelsäure durch einmaliges Anreiben, dann auf dem Filter ausgewaschen, Filtrat auf 187 g aufgefüllt. Der Niederschlag erforderte zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten

*) Ich benutzte bei allen Versuchen Glasgefäße mit gut eingeschliffenen Glasstopfen, die außerdem mit Pergamentpapier überbunden werden. Alles Untersuchungsmaterial, besonders auch alle schon zur Analyse vorbereiteten Lösungen wurden ausnahmslos durch reichlich bemessenen Zusatz von Chloroform bezw. Chloroform und Toluol sicher gegen Zersetzung durch Bakterien geschützt, auch wo dies nicht besonders erwähnt ist.

**) Das Auswaschen solcher Rückstände führe ich stets in der Weise aus, daß ich die Masse möglichst vollständig vom Filter nehme, im Mörser mit heißem Wasser anrühre und von neuem auf das Filter bringe. Wird das Filter beim Abnehmen des Niederschlags beschädigt, dann wird es ebenfalls mit ausgelaugt. Bei reichlichen Filterrückständen wird dies Verfahren noch ein oder zweimal wiederholt und dann das Auswaschen auf dem Filter zu Ende geführt. — In der gewöhnlichen Weise, durch einfaches Aufgießen von Wasser auf den Niederschlag im Filter, lassen sich derartige Niederschläge nur schwierig genügend auswaschen.

Ammoniaks 27,4 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,03836 N. Je 62,3 g des Filtrats erforderten zur Bindung des durch Erhitzen mit 10 g kristallisierter Phosphorsäure bei 150° abgespaltenen Ammoniaks

$$\left.\begin{array}{l} a)\ 7{,}74\ ccm\ \frac{n}{10}\text{-}H_2SO_4 \\ b)\ 7{,}74\ ccm\ \frac{n}{10}\text{-}H_2SO_4 \end{array}\right\} = 0{,}0108\ g\ N.$$

Im ganzen Filtrat daher 0,0324 g N.

Demnach enthalten 100 ccm der Flüssigkeit 0,6720 g Gesamtstickstoff. Davon sind durch Phosphorwolframsäure fällbar 0,1918 g (darin 0,0372 g Ammoniakstickstoff), durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar 0,4802 g (davon nach Schöndorff spaltbar 0,1620 g).

Der Rest der Flüssigkeit (= 4800 ccm) wurde mit verdünnter Schwefelsäure bis zu 5 Proz. und dann so lange mit 20 proz. Phosphorwolframsäure versetzt, bis das Filtrat bei neuem Zusatz von Phosphorwolframsäure 10 Sekunden lang klar blieb. Diese starke Verdünnung der Flüssigkeit wurde absichtlich gewählt, um die Ausfällung des Phenylalanins zu verhüten. Nach dem Absetzen wurde die Flüssigkeit abgehebert, der massenhafte Niederschlag auf der Nutsche abgesogen, der Rückstand mit 5 Litern 5 proz. Schwefelsäure verrieben und wieder auf der Nutsche scharf abgesogen. Durch Abnehmen des Niederschlags von der Nutsche, Verreiben im Mörser und nochmaliges Absaugen ließ sich noch etwas Flüssigkeit daraus gewinnen. Die vereinigten Filtrate bezeichne ich als A (Aminosäurefraktion), den Niederschlag als B (Basenfraktion).

B.

Der Niederschlag wurde mit Wasser verrieben und mit Barytlösung zerlegt, abgesogen, einmal mit 5 Litern warmen Wassers angerührt, abgesogen, dann noch 2 mal mit je 3 Litern Wasser ausgekocht. Die Filtrate mit Kohlensäure gesättigt, eingedampft, das Barymkarbonat abfiltriert, ausgewaschen und die Filtrate auf 1¹/₄ Liter eingedampft. Die Flüssigkeit war tief gelb, reagierte stark alkalisch und gab schmutzigviolette Biuretreaktion. — Nach dem Vorgange Kutschers wurde sie mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit Silbernitratlösung versetzt, bis ein Tropfen der Flüssigkeit bei Zusatz von Barytwasser im Überschuß Braunfärbung gab (Niederschlag = B I). Das Filtrat wurde mit Barytwasser versetzt, bis eine abfiltrierte Probe bei vorsichtigem Zusatz von verdünntem Ammoniak keine weiße Trübung mehr gab (Niederschlag = B II). Das Filtrat wurde bei 38 bis 40° mit pulverisiertem Baryt gesättigt (Niederschlag = B III). Das Filtrat hiervon wurde durch Schwefelsäure von Baryt und durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit, mit Schwefelsäure bis zu 5 Proz. versetzt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt (Niederschlag = B IV). Das Filtrat wurde in üblicher Weise durch Baryt von Phosphorwolframsäure befreit und der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt. Das eingedampfte Filtrat lieferte noch eine kleine Menge Tyrosin. —

B I. Alloxurbasenfraktion.

Der Niederschlag wurde gewaschen, mit Wasser verrieben, mit Ammoniak im Überschuß versetzt und unter öfterem Umschütteln 48 Stunden verschlossen stehen gelassen, abfiltriert und ausgewaschen. Aus den Silberverbindungen wurden die freien Basen nach dem Verfahren

von Krüger und Salomon dargestellt. Der Niederschlag wurde mit Wasser verrieben und bei Wasserbadwärme vorsichtig mit Salzsäure zerlegt, nach Zusatz der vorgeschriebenen Menge Salzsäure aufgekocht, die Flüssigkeit filtriert, mit stark verdünnter Salzsäure ausgewaschen und die Salzsäure in vorschriftsmäßiger Weise entfernt. Der trockne Rückstand wurde mit Wasser von 40° digeriert, filtriert, mit Wasser salzsäurefrei, danach mit Alkohol und Äther gewaschen. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand nochmals in der beschriebenen Weise behandelt. Die vereinigten Rückstände bezeichne ich als R. Der wässerige Auszug wurde mit Ammoniak in geringem Überschuß versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, einmal mit schwach ammoniakalischem, dann mit reinem Wasser gewaschen, in Wasser unter Zusatz von wenig Salzsäure gelöst, wieder mit Ammoniak gefällt und mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,2 g analysenreines Guanin. Die Substanz gab die Xanthinprobe in der für Guanin charakteristischen Weise.

Analyse.

0,1007 g gaben 39,1 ccm Stickstoff bei 15° und 763 mm Druck = 45,66 Proz. N. Für Guanin, $C_5H_5N_5O$ berechnet = 46,36 Proz.

Das Filtrat vom Guanin wurde durch gelindes Erhitzen von Ammoniak befreit und mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösuug versetzt. Es trat nur eine geringe Trübung ein, die sofort abfiltriert wurde und auf dem Filter nur einen sehr geringen Belag bildete. Adenin konnte demnach höchstens in Spuren vorhanden sein. Aus dem Filtrat wurde nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure die Pikrinsäure durch Benzol entfernt, das etwas eingedampfte Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Aus dem Niederschlag wurden die freien Basen abgeschieden. Sie wurden in heißer verdünnter Salpetersäure gelöst. Nach dem Erkalten schieden sich Drusen wetzsteinförmiger Kristalle ab, die mit verdünnter Salpetersäure, dann mit Alkohol und Äther gewaschen wurden.

Die Ausbeute betrug 0,8 g. Da die Substanz etwas gefärbt war, wurde ein Teil in Wasser gelöst, mit Silbernitrat in die Silberverbindung übergeführt, diese in heißer Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,1 gelöst, der beim Erkalten abgeschiedene Niederschlag durch Digerieren mit Ammoniak in die salpetersäurefreie Silberverbindung übergeführt und abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit Wasser verrieben und bei Siedehitze durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat wurde zur Entfernung noch beigemengten Silbers zur Trockne verdampft, der Rückstand in heißem Wasser gelöst, die filtrierte Lösung bis auf ein kleines Volumen eingedampft und nach dem Erkalten die ausgeschiedene Substanz abfiltriert und getrocknet.

Analyse.

0,0776 g gaben 27,0 ccm N bei 9,5° und 758 mm Druck = 41,65 Proz. N. Für Hypoxanthin, $C_5H_4N_4O$ berechnet = 41,18 Proz. N.

Das Filtrat vom Hypoxanthinnitrat ergab bei der weiteren Untersuchung nur eine geringe Menge von Basen, sodaß deren Identifizierung nicht möglich war.

Der ungelöste Teil (R) des Basengemisches wurde in der vorgeschriebenen Menge heißer, 3,3proz. Natronlauge gelöst. Da innerhalb 24 Stunden keine Ausscheidung erfolgte, wurde die Flüssigkeit in ein

aufgekochtes und wieder erkaltetes Gemisch aus gleichen Volumen konzentrierter Salpetersäure und Wasser eingegossen und 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Der abgeschiedene stark gefärbte Niederschlag wurde mit heißem Wasser verrieben und durch Zusatz der eben erforderlichen Menge $\frac{n}{10}$-NaOH gelöst. Die filtrierte Lösung wurde mit Essigsäure angesäuert und der Niederschlag nach 24 Stunden abfiltriert, nochmals in obiger Weise in Lösung gebracht, ausgefällt, gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,25 g. Die Substanz gab die Xanthinprobe.

Analyse.

0,0827 g gaben 26,3 ccm Stickstoff bei 16° und 757 mm Druck = 36,94 Proz. N. Für Xanthin, $C_5H_4N_4O_2$ berechnet = 36,84 Proz.

Im Filtrat vom Xanthinnitrat war nur noch eine unbedeutende zur Untersuchung nicht ausreichende Menge basischer Substanz enthalten.

BII. Histidinfraktion.

Der ausgewaschene Niederschlag wurde mit Wasser verrieben, die Flüssigkeit mit Schwefelsäure angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Schwefelsäure mit Baryt, der Überschuß an Baryt mit Kohlensäure entfernt und das Filtrat zum Sirup eingedampft. Beim Erkalten schieden sich Drusen von 5 bis 7 mm langen Kristallen aus, die abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen wurden. Aus dem Filtrat ließen sich durch Eindampfen noch weitere Portionen der gleichen Kristalle gewinnen. Die letzte, stark alkalisch reagierende Mutterlauge wurde nach den Angaben Kossels mit der erforderlichen Menge Schwefelsäure versetzt und mit Quecksilbersulfatlösung gefällt. Aus dem Quecksilberniederschlag ließ sich in geringer Menge das Chlorid einer Base gewinnen, das die charakteristische Kristallform des Histidindichlorids aufwies. Zur Analyse reichte die Menge nicht aus. Das Filtrat von der Quecksilberfällung enthielt anscheinend noch eine andere basische Substanz, die sich aber nicht in analysierbare Form bringen ließ. Die oben beschriebenen großen Kristalle wurden durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt. Die gereinigte Substanz war in Wasser ziemlich leicht löslich und enthielt reichlich Salpetersäure und Baryum. Ihre wässerige Lösung wurde durch Silbernitrat nicht getrübt, bei Zusatz von Ammoniak entstand dann ein dicker Niederschlag, der im Überschuß von Ammoniak leicht löslich war. Die Substanz verhielt sich demnach wie ein Doppelsalz aus Histidinnitrat und Baryumnitrat.

Die Substanz wurde nun in Wasser gelöst, der Baryt genau mit Schwefelsäure ausgefällt und das sauer reagierende Filtrat zum Sirup eingedampft. Beim Erkalten kristallisierte dieser vollständig. Durch Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle wurde die Substanz in großen weißen prismatischen Kristallen erhalten, die abgesogen, mit Alkohol gewaschen und getrocknet wurden. Die Substanz enthielt reichlich Salpetersäure, gab beim Erhitzen die Biuretprobe und verhielt sich gegen Silbernitrat und Ammoniak wie Histidin.

Die Ausbeute betrug 1,5 g.

Analyse.

0,1034 g gaben 22,3 ccm Stickstoff bei 12° C und 756 mm Druck = 25,47 Proz. N.

Für Histidindinitrat, $(C_6H_9N_3O_2 . 2 HNO_3)$ berechnet = 24,91 Proz.

Ein Teil der Substanz wurde nach Hedin in die Silberverbindung übergeführt. 0,1143 g gaben 0,0641 g Ag = 56,08 Proz. Ag.

Für $C_6H_7Ag_2N_3O_2 . H_2O$ berechnet = 55,81 Proz. Ag.

BIII. Argininfraktion.

Der mit Barytwasser ausgewaschene Niederschlag wurde durch Schwefelsäure von Baryt, durch Schwefelwasserstoff von Silber und durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit. Filtrat und Waschwasser wurden zum Sirup eingedampft. Da dieser auch nach langem Stehen in der Kälte keine Kristalle ausschied, wurde er nach der Vorschrift von Kossel mit Salpetersäure gesättigt. Es gelang aber nicht, eine Kristallisation von Argininnitrat zu erzielen, auch nicht nach langem Stehen im Exikkator. Der lackartige Rückstand wurde daher in die Kupferverbindung übergeführt. Alle Versuche, daraus eine kristallisierende Verbindung zu erhalten, schlugen fehl. Die Masse wurde von Kupfer befreit, das Filtrat mit 5 Proz. Schwefelsäure versetzt, mit Phosphorwolframsäure gefällt, der reichliche Niederschlag ausgewaschen, mit Baryt zersetzt und der Überschuß von Baryt durch Kohlensäure entfernt. Das barytfreie, alkalisch reagierende, zum Sirup eingedampfte Filtrat kristallisierte weder direkt noch nach der Überführung in die Salpetersäureverbindung. Leider war es mir zur Zeit der Untersuchung nicht möglich, ein brauchbares Präparat von Picrolonsäure zu erhalten, sodaß mir dieser Weg zur Isolierung des Arginins verschlossen war. Meine Bemühungen, durch fraktionierte Fällung mit Silbernitrat und Baryt, durch Überführung in die Platin- bzw. Pikrinsäureverbindung zu einer kristallisierbaren Substanz zu gelangen, hatten keinen Erfolg.

BIV. Lysinfraktion.

Der gewaschene Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in üblicher Weise auf die freien Basen verarbeitet. Die barytfreie Flüssigkeit gab beim Eindampfen einen stark alkalisch reagierenden Sirup, der nach Kossel mit alkoholischer Pikrinsäurelösung unter Zusatz von Alkohol gefällt wurde. Im Gegensatze zu früheren eigenen Beobachtungen ließ sich die Ausfällung der Pikrate hier nur schwierig bewirken, trotzdem ein Überschuß von Pikrinsäure sorgfältig vermieden wurde. Der erhaltene harzige Niederschlag wurde mehrfach mit Alkohol ausgekocht und aus Wasser umkristallisiert (Zeichen „L"). Der alkoholische Auszug wurde mit dem Filtrat von der ursprünglichen Pikrinsäurefällung vereinigt, der Alkohol verdampft, der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und durch Äther von Pikrinsäure befreit. Nach dem Verjagen des Äthers wurde die Flüssigkeit auf 5 Proz. Schwefelsäuregehalt gebracht und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der in üblicher Weise auf freie Basen verarbeitete Phosphorwolframsäureniederschlag lieferte einen alkalisch reagierenden Sirup, der bei nochmaliger Behandlung mit alkoholischer Pikrinsäurelösung und Alkohol eine winzige Menge eines schwerlöslichen Pikrats gab. Das Filtrat wurde wieder von Alkohol und Pikrinsäure befreit, mit Phosphorwolframsäure gefällt und auf freie Basen verarbeitet. Der erhaltene alkalisch reagierende Sirup wurde mit Salzsäure neutralisiert und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure eingeengt. Die Masse blieb amorph. Die Versuche, durch Überführung in Platinverbindungen, bzw. Benzoylierung zu kristallisierbaren Substanzen zu gelangen, waren ebenso

vergeblich wie der Versuch, nach Kutschers Vorschrift[13]) Cholin nachzuweisen. Ein Anhalt für die Gegenwart von Cadaverin hat sich nicht ergeben.

Analyse des Pikrats („L").

0,2006 g gaben 0,2811 g CO_2 und 0,0814 g H_2O = 38,22 Proz. C und 4,55 Proz. H.

Für Lysinpikrat berechnet = 38,40 Proz. C und 4,53 Proz. H.

Die Ausbeute an Lysinpikrat betrug 1,2 g.

A. (Aminosäuren-Fraktion.)

Die Flüssigkeit wurde zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryt in geringem Überschuß versetzt, der Baryt durch vorsichtigen Zusatz von Schwefelsäure bis auf einen sehr geringen Rest entfernt. Das Filtrat wurde zum Sirup eingedampft und an einen kühlen Ort gestellt, um das Tyrosin möglichst vollständig zur Abscheidung zu bringen. Es kristallisierte eine reichliche Menge in Gestalt großer weißer Drusen aus. Nach dem Verdünnen der Masse mit Wasser wurde das Tyrosin abgesogen, mit kaltem Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Seine Menge betrug 5,2 g. Ein Teil wurde nach dem Verfahren von Habermann und Ehrenfeldt[14]) mit Eisessig erwärmt, abfiltriert, mit Eisessig, Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und analysiert.

0,1379 g gaben 0,3013 g CO_2 und 0,0765 g H_2O = 59,59 Proz. C und 6,22 Proz. H.

Für Tyrosin berechnet = 59,66 Proz. C und 6,07 Proz. H.

0,5 g in 9,5 g 21proz. Salzsäure gelöst zeigten bei 1 dcm Rohrlänge im Saccharimeter eine Linksdrehung von 0,35°.

Das Filtrat vom Tyrosin wurde bis zur Honigkonsistenz eingedampft und in den Eisschrank gestellt. Es schied sich nur noch wenig Tyrosin und zwar nur in mikroskopischen Kristallen aus, eine Probe der Flüssigkeit gab nur relativ schwache Millonsche Reaktion. Demnach war das Tyrosin in der Hauptsache entfernt. — Die Masse wurde mit etwas Wasser verdünnt, auf der Nutsche abgesogen, mit wenig kaltem Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Durch Eindampfen der Mutterlauge, Abnutschen der ausgeschiedenen Massen und noch zweimalige Wiederholung der gleichen Operationen ließen sich im ganzen 36 g Substanz gewinnen, die einen großen Teil des gebildeten Leucins enthalten mußten. Ich bezeichne diese Substanz als „Roh-Leucin". Weitere Mengen ließen sich in dieser Weise nicht gewinnen, da beim Auswaschen, selbst mit 50proz. Alkohol, alles wieder in Lösung ging. Die letzte Mutterlauge wurde daher heiß mit Zinkoxyd gesättigt[15]), filtriert und zum Sirup verdampft. Selbst nach tagelangem Stehen trat die Abscheidung eines Zinksalzes nicht ein. Es gelang also nicht, Glutaminsäure in Gestalt ihres Zinksalzes zu gewinnen. Die Masse wurde daher nach dem Verdünnen mit Wasser durch Schwefelwasserstoff von Zink befreit, Filtrat und Waschwässer etwas eingedampft und in 2 Portionen im Kutscherschen Extraktionsapparat[16]) (von 500 ccm Inhalt) einer erschöpfenden Extraktion mit Äther unterzogen. Nach Beendigung der Extraktion wurde die Ätherlösung aus dem Kolben gegossen, der Kolben mit Äther nachgespült. (Ätherlösung = Ae.) Im Kolben verblieb ein brauner, in kaltem Wasser nur teilweise, in heißem Wasser leicht vollständig löslicher Bodensatz. Zur Reinigung wurde die Substanz in heißem Wasser gelöst, die Lösung

mit Tierkohle erhitzt, filtriert und das Filtrat eingedampft. Beim Erkalten schieden sich farblose Kristalle aus, die abgesogen, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurden. Durch Einengen der Mutterlauge ließen sich ebenfalls noch Kristalle erhalten. Die Gesamtmenge betrug 0,15 g. Die Substanz war schwefelfrei, enthielt aber Stickstoff; bei vorsichtigem Erhitzen sublimierte die Hauptmenge, während sich ein Teil unter Braunfärbung zersetzte. Sie war ohne Rückstand flüchtig, gab keine Kupferverbindung und reagierte in wässeriger Lösung auf Lackmuspapier neutral. Die wässerige salpetersaure Lösung der Substanz wurde durch Silbernitrat nicht getrübt; bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniak entstand dagegen eine sehr voluminöse Fällung, die im Überschuß von Ammoniak leicht löslich war.

Analyse.

0,0538 g gaben 0,0938 g CO_2 und 0,0229 g H_2O = 47,55 Proz. C und 4,77 Proz. H.

Für Thymin berechnet = 47,62 Proz. C und 4,76 Proz. H.

Bromwasser wurde durch die Substanz entfärbt. Da das Material aufgebraucht war, ließ sich leider keine Stickstoffbestimmung ausführen. Durch die beschriebenen Reaktionen und das Ergebnis der Analyse ist indessen die Identität der Substanz mit dem Thymin festgestellt.

Die Ätherlösung (Ae) hinterließ nach dem Verdunsten des Äthers einen stark sauer reagierenden Sirup. Obgleich nach dem Gange der Untersuchung flüchtige Fettsäuren kaum mehr vorhanden sein konnten, wurde der Rückstand nach dem Verdünnen mit Wasser längere Zeit mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat reagierte sehr schwach sauer. Es wurde mit Soda übersättigt, auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Phosphorsäure angesäuert und wieder mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat reagierte nahezu neutral auf Lackmus, eine flüchtige Fettsäure ließ sich darin nicht nachweisen. Eine Probe des Destillationsrückstandes gab mit verdünnter Eisenchloridlösung intensive Gelbfärbung, wodurch die Anwesenheit von Milchsäure wahrscheinlich gemacht wurde. Der Rückstand wurde mit Äther erschöpft und der Ätherauszug bei gewöhnlicher Temperatur verdunstet. Es verblieb ein stark sauer reagierender sirupöser Rückstand, der sich quantitativ in milchsaures Zink überführen ließ. Seine Menge betrug 0,43 g.

Analyse.

0,2162 g (bei 120° getrocknet!) gaben 0,0728 g ZnO = 33,67 Proz. ZnO.

Für wasserfreies milchsaures Zink berechnet = 33,33 Proz. ZnO.

Die wässerige Lösung des Zinksalzes war linksdrehend, die vorhandene Säure demnach Paramilchsäure. Der mit Äther erschöpfte Rest der Amidosäurenfraktion wurde mit Wasser verdünnt und in der Hitze mit Kupferkarbonat gesättigt. Aus dem Filtrat schied sich beim Erkalten eine schwer lösliche Kupferverbindung nicht ab; auch nach dem Eindampfen und Stehenlassen in der Kälte wurde ein schwerlösliches Kupfersalz nicht erhalten. Die Masse war dagegen durchsetzt mit mikroskopischen Kugeln von der Gestalt des rohen Leucins. Sie wurde nun durch Schwefelwasserstoff von Kupfer befreit, Filtrat und Waschwässer auf etwa 200 ccm eingedampft, stark abgekühlt und unter fortgesetztem Kühlen mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Das Gefäß wurde dann in einem Behälter mit Eis mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt. Eine Abscheidung von Glutaminsäurechlorhydrat trat dabei nicht ein. Die Flüssigkeit wurde dann mit

700 ccm absolutem Alkohol gemischt und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt, der Alkohol im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit 600 ccm absolutem Alkohol gemischt, wieder verestert, der Alkohol wieder abdestilliert und der Rückstand mit 500 ccm absolutem Alkohol nochmals verestert. Die Flüssigkeit wurde dann abgekühlt und in den Eisschrank gestellt. Trotz Impfens mit einem Kristall von Glykokollesterchlorhydrat trat eine Abscheidung von Glykokollesterchlorhydrat nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank nicht ein. Nachdem der Alkohol bei 35 bis 40° unter stark vermindertem Druck abdestilliert worden war, wurde die Veresterung nochmals wiederholt, der Alkohol wieder in gleicher Weise entfernt und der Rückstand auf die freien Ester nach dem Verfahren von Fischer verarbeitet. Er wurde im Paraffinbad einer zweimaligen fraktionierten Destillation bei 8 bis 10 mm Druck unterzogen.

Erhalten wurden bei:

I.	40 bis 55°	(Temperatur der Dämpfe)	1,5 g
II.	55 bis 69°	„ „ „	1,3 „
III.	69 bis 82°	„ „ „	3,5 „
IV.	82 bis 101°	„ „ „	2,5 „
V.	101 bis 124°	„ „ „	2,5 „
VI.	125 bis 170°	„ „ „	wenige Tropfen.

Offenbar fand bei dieser Temperatur schon weitgehende Zersetzung des Kolbeninhalts statt. Der Rückstand bildete eine braune Masse von Honigkonsistenz, deren Verarbeitung keine reine Substanz lieferte.

Um die in den ausgeätherten Massen noch vorhandenen Reste von Estern zu gewinnen, wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, eingedampft, von den Salzen möglichst befreit, der beträchtliche steifsirupöse Rückstand zweimal verestert; die salzsauren Ester wurden nach den Angaben Skraups[17]) mit Alkoholäther abgeschieden und in die freien Ester verwandelt. Um die durch Alkoholätherextraktion etwa nicht gewonnenen Ester noch möglichst abzuscheiden, wurde die Masse nochmals nach dem Verfahren von Fischer behandelt. Nachdem sämtliche Auszüge vereinigt und Alkohol und Äther unter stark vermindertem Druck abdestilliert waren, verblieb nur eine relativ kleine Menge von Estern, die ebenfalls fraktioniert wurden. — Druck 8 bis 9 mm.

Erhalten wurden bei:

VII.	40 bis 60°	(Temperatur der Dämpfe)	0,5 g
VIII.	60 bis 80°	„ „ „	0,4 „
IX.	80 bis 160°	„ „ „	0,2 „

Im Kolben verblieb ein zäher brauner Rückstand, der nicht verarbeitet wurde.

Wie oben angegeben ist, waren durch Eindampfen der Aminosäurenfraktion (A) 36 g „Roh-Leucin" erhalten worden. Diese Substanz war inzwischen ebenfalls verestert, die freien Ester nach Fischer abgeschieden und bei 6 bis 9 mm destilliert worden.

Folgende Fraktionen wurden erhalten:

X.	Bis 70°	(Temperatur der Dämpfe)	1 g
XI.	70 bis 90°	„ „ „	Hauptmenge*)
XII.	90 bis 125°	„ „ „	1 g
XIII.	125 bis 160°	„ „ „	geringe Menge.

Der harzige Kolbenrückstand wurde nicht untersucht.

*) Leider wurde ein beträchtlicher Teil dieser Fraktion verschüttet, sodaß sich die Menge nicht feststellen ließ.

Die Veresterung der einzelnen Fraktionen erfolgte sofort nach ihrer Darstellung, und zwar, ebenso wie die weitere Verarbeitung unter Anwendung der von Fischer und seinen Schülern ausgearbeiteten Methoden.

Die aus Präparat I und VII gewonnenen Aminosäuren wurden zusammen verarbeitet und durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser bzw. verdünntem Alkohol in 3 Portionen zerlegt, die sämtlich in Wasser leicht löslich waren und süßen Geschmack besaßen.

1. Fraktion.

0,1355 g gaben 0,2236 g CO_2 und 0,1040 g H_2O = 45,01 Proz. C und 8,60 Proz. H.

Berechnet für Alanin 40,45 Proz C und 7,87 Proz. H.

Berechnet für Aminovaleriansäure 51,28 Proz. C und 9,40 Proz. H.

2. Fraktion.

0,2140 g gaben 0,3310 g CO_2 und 0,1556 g H_2O = 42,18 Proz. C und 8,15 Proz. H.

3. Fraktion.

0,1434 g gaben 0,2213 g CO_2 und 0,1041 g H_2O = 42,09 Proz. C und 8,14 Proz. H.

Ein Teil dieser Fraktion wurde in die Kupferverbindung übergeführt, der in Wasser leicht lösliche Anteil zur Kristallisation gebracht und nach dem Trocknen bei 105° analysiert.

0,2908 g gaben 0,0892 g CuO = 30,67 Proz. CuO.

Für Alaninkupfer ($[C_3H_6NO_2]^2Cu + H_2O$) berechnet 30,88 Proz. CuO.

Der Rest dieser Fraktion (= 0,25 g), in 4,5 ccm 25 proz. Salzsäure gelöst, zeigte bei 1 dcm Rohrlänge im Saccharimeter 0,3 Proz. Rechtsdrehung.

Eine andere Aminosäure ließ sich nicht isolieren.

Präparat II wurde vergeblich auf α-Pyrrolidinkarbonsäure untersucht. Auch eine andere einheitliche Amidosäure wurde nicht erhalten.

Die aus Präparat III und Präparat IV erhaltenen Aminosäuren wurden gesondert mit der 10 fachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht, die alkoholischen Auszüge vereinigt und verdunstet. Es gelang nicht, in den geringen Rückständen α-Pyrrolidinkarbonsäure nachzuweisen.

Der alkoholunlösliche Teil von Präparat III betrug 1,8 g. Trotz wiederholter fraktionierter Kristallisation wurden keine einheitlichen Aminosäuren gewonnen. Ein schwerlöslicher Anteil gab bei der Analyse Werte, die denen des Leucins nahestehen.

0,2054 g gaben 0,3960 g CO_2 und 0,1736 g H_2O = 52,58 Proz. C und 9,47 Proz. H.

Für Leucin berechnet = 54,96 Proz. C und 9,92 Proz. H.

Ein leichter löslicher Anteil von süßem Geschmack gab Werte, die zwischen denen des Alanins und Leucins stehen.

0,1593 g gaben 0,2813 g CO_2 und 0,1327 g H_2O = 48,16 Proz. C und 9,34 Proz. H.

Bei der Analyse einer weiteren Fraktion wurden Werte erhalten, die sich den für Aminovaleriansäure verlangten nähern: 0,1076 g gaben 0,1915 g CO_2 und 0,0878 g H_2O = 48,54 Proz. C und 9,16 Proz. H.

Die Präparate IV, V, VI, IX, XII und XIII wurden erfolglos auf Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure untersucht.

Präparat VIII lieferte eine kleine Menge Leucin, Präparat X (zum Teil aus Alkohol bestehend) lieferte keine einheitliche Amidosäure.

Präparat XI bestand in der Hauptsache aus Leucin. α-Pyrrolidinkarbonsäure ließ sich auch in diesem Präparat nicht auffinden. Aus dem in Alkohol unlöslichen Teil wurden durch Kristallisation 4 Fraktionen dargestellt.

1. Fraktion. 2,7 g.

0,1199 g gaben 0,2413 g CO_2 und 0,1076 g H_2O = 54,89 Proz. C und 10,06 Proz. H.

Für Leucin berechnet = 54,96 Proz. C und 9,92 Proz. H.

Schmelzpunkt 291° (uncorr.).

0,4 g in 14,6 g 21 proz. Salzsäure gelöst zeigten bei 1 dcm Rohrlänge im Saccharimeter eine Rechtsdrehung von 0,6 Proz.

2. Fraktion. 1,9 g.

0,1132 g gaben 0,2280 g CO_2 und 0,1018 g H_2O = 54,93 Proz. C und 10,08 Proz. H.

Rechtsdrehung der salzsauren Lösung wie bei der ersten Fraktion.

3. Fraktion. 1,2 g.

0,1395 g gaben 0,2778 g CO_2 und 0,1233 g H_2O = 54,31 Proz. C und 9,91 Proz. H.

Rechtsdrehung der salzsauren Lösung wie bei der ersten Fraktion.

4. Fraktion. 0,8 g.

Die Substanz besaß süßlichen Geschmack; die Isolierung und sichere Identifizierung einer einheitlichen Aminosäure gelang nicht.

Zweiter Versuch.

c) Lienal-myelogene Leukämie*). 22 jähriges Mädchen. Tod am 13. VII. 03. 5 Stunden nach dem Tode wurden 475 g der Milz genau in der im Hauptversuch beschriebenen Weise einer dreiwöchentlichen Autolyse unterworfen und in genau entsprechender Weise verarbeitet. Ferner wurden 6 Stunden nach dem Tode 250 g Milzbrei mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser unter Zusatz von Essigsäure aufgekocht, filtriert; der Rückstand wurde gut ausgewaschen, das Filtrat auf 1 Liter aufgefüllt und mit 1 Proz. Chloroform versetzt.

Nachdem der Gehalt an Gesamtstickstoff und Ammoniak festgestellt war, wurde ein größerer Teil zur qualitativen Untersuchung verwandt.

Von der autolysierten Portion wurde ein Teil zur Bestimmung des Stickstoffgehalts, die Hauptmenge, entsprechend 420 g Milz, zur Untersuchung auf Spaltungsprodukte benutzt.

Analysen.

Gekochte Portion. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 10,14 ccm $\frac{n}{10}$-Schwefelsäure.
b) 10,22 ccm „

Mittel 10,18 ccm = 0,01425 g N.

In 100 g Milz (enteiweißt) daher 0,5700 g N.

40 ccm erforderten zur Bindung des durch Magnesia im Vakuum bei 37° austreibbaren Ammoniaks 1,09 ccm $\frac{n}{10}$-Schwefelsäure = 0,001526 g N.

In 100 g Milz (enteiweißt) daher 0,01526 g Ammoniakstickstoff.

---

*) Es ist derselbe Fall, bei dem ich die in diesen Beiträgen [4, 446 (1904)] beschriebene Blutuntersuchung ausgeführt habe.

II.

Über die Autolyse des leukämischen Knochenmarks.

Bei einem Falle von lienal-myelogener Leukämie*) wurden 13 Stunden nach erfolgtem Tode 26 g Knochenmark (aus den Oberschenkelknochen) entnommen und im Mörser gut zerquetscht und gemischt. Eine Hälfte wurde mit 26 ccm Wasser vermischt, mit Essigsäure schwach angesäuert, aufgekocht und nach dem Erkalten mit 1 ccm Chloroform und 2 ccm Toluol versetzt. Die andere Hälfte wurde mit 1 ccm Chloroform und 2 ccm Toluol versetzt, bis zum nächsten Tage in einer Flasche im Zimmer stehen gelassen, die Sterilität festgestellt. Beide Portionen wurden in den Brutschrank gebracht und nach 6 Monaten untersucht. Die gekochte Portion war farblos, die ungekochte tief gelb. Beide Portionen enthielten reichlich Chloroform und Toluol und waren steril. Sie wurden in gleicher Weise bei schwach saurer Reaktion aufgekocht, filtriert, nach Auswaschen des Rückstandes die Filtrate je auf 60 ccm aufgefüllt und in gleicher Weise auf Eiweißspaltungsprodukte untersucht.

	Autolysierte Portion	Gekochte Portion
Biuretprobe	fast negativ	negativ
Tryptophanreaktion	positiv	negativ
Sättigung mit Ammoniumsulfat	sehr geringe Trübung	sehr geringe Trübung
Millons Reaktion	intensiv rote Lösung	wenige rosa gefärbte Eiweißflöckchen
Fällung mit Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Salzsäure	sehr reichlicher Niederschlag	geringer Niederschlag
Beim Eindampfen von 30 ccm verbleibt	relativ beträchtlicher Rückstand, in dem mikroskopisch zahllose Leucinkugeln gefunden wurden. Beim Kochen mit Kupferkarbonat tiefblaue Lösung	sehr geringer Rückstand, mikrospisch ohne Befund. Beim Kochen mit Kupferkarbonat keine Spur von Blaufärbung.

Wenngleich bei der kleinen Menge Material die Isolierung von einheitlichen Verdauungsprodukten garnicht erst versucht

*) Es ist der im ersten Teil dieser Abhandlung unter „b“ angegebene Fall.

wurde, so kann doch nach dem Ausfall obiger Proben nicht bezweifelt werden, daß eine ganze Anzahl von Spaltungsprodukten entstanden war, und zwar sowohl basische wie saure. Im einzelnen ist die Anwesenheit von Tyrosin, Leucin und Skatolaminoessigsäure wahrscheinlich gemacht.

III.
Über den Umfang der Eiweißspaltung bei der Autolyse der leukämischen und der normalen Milz.

Bei genügend langer Dauer wird fast die Gesamtmenge der in der leukämischen Milz vorhandenen Eiweißkörper aufgespalten, wie der folgende Versuch beweist:

Ein 230 g schweres Stück Milz*) wurde 6 Stunden nach dem Tode mit sterilem Wasser abgespült und in ein luftdicht verschließbares, etwa 200 ccm Chloroformwasser enthaltendes Glasgefäß gebracht, Chloroform (10 ccm) zugesetzt, das Ganze kräftig durchgeschüttelt und verschlossen bis zum nächsten Tage im Zimmer stehen gelassen. Eine erneute Prüfung ergab die Sterilität der Masse. Das Gefäß wurde nun in den Brutofen gestellt und häufig umgeschüttelt. Nach einigen Tagen hatte sich an der Gefäßwandung ein aus Tyrosin bestehender weißer Belag gebildet. Das Gefäß blieb 4 Wochen im Brutschrank stehen. In der Zwischenzeit wurde der Inhalt wiederholt auf die Anwesenheit von Bakterien untersucht, ebenso am Ende der Digestion, aber stets mit negativem Erfolge. Das Stück Milz war bis auf einige lange, zähe, aus Bindegewebe bestehende, bandartige Reste zergangen, die perlschnurartig mit Tyrosindrusen besetzt waren. Lymphatische Elemente wurden in diesen Gewebsresten nicht aufgefunden. Die groben Reste wurden abgespült, mit Wasser unter Zusatz von wenig Essigsäure ausgekocht, mit Alkohol und Äther gewaschen und der Stickstoffgehalt**) ermittelt. Er betrug 0,015 g. Die übrige Verdauungsflüssigkeit wurde nach Zerreiben der abgesetzten Tyrosinkörner kräftig durchgeschüttelt und darin der Stickstoffgehalt bestimmt. Der ermittelte Wert zuzüglich 0,015 g für den im erwähnten Rückstand enthaltenen Stickstoff ergab den Gesamtstickstoff der in Arbeit genommenen Menge Milz.

---

*) Die Milz stammte von demselben Falle, bei dem ich eine Untersuchung des Blutes ausgeführt habe, vergl. Diese Beiträge **4**, 446 (1904). Die bakteriologische Untersuchung ergab, daß die Milz steril war.

**) Wegen der wahrscheinlichen Anwesenheit von Hämatin wurde das Erhitzen mit Schwefelsäure bei Gegenwart von Quecksilber 14 Stunden lang fortgesetzt.

Ein Teil der Verdauungsflüssigkeit wurde mit Soda neutralisiert, mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert, aufgekocht, filtriert und der Rückstand mit heißem Wasser ausgewaschen. Im Filtrat wurde der Stickstoff bestimmt.

Vom Gesamtstickstoff (= 5,9762 g) waren vorhanden in der enteiweißten Verdauungsflüssigkeit 5,3636 g = 89,7 Proz.; im ungelösten Rückstande und den koagulablen Eiweißstoffen 0,6129 g = 10,3 Proz.*)

Die enteiweißte Flüssigkeit enthielt Albumosen, und zwar vorwiegend „sekundäre", in mäßiger Menge und gab ziemlich starke Tryptophanreaktion. (Der durch Bromwasser bewirkte Niederschlag gab mit Alkohol eine schön violette Lösung.) Ein Teil der nicht enteiweißten Verdauungsflüssigkeit wurde filtriert, der geringe Rückstand ausgewaschen, mit Wasser angerieben und mit $\frac{n}{10}$-Kalilauge versetzt, wobei ein Teil in Lösung ging.

Das Filtrat wurde mit Salzsäure angesäuert, die ausfallenden Flocken abfiltriert und sorgfältig ausgewaschen. Der getrocknete Rückstand wurde mit phosphorfreier Soda und Salpeter geschmolzen und das angesäuerte Filtrat mit Ammoniummolybdatlösung geprüft, wobei eine starke Phosphorsäurereaktion erhalten wurde. Sie war schätzungsweise ebenso stark wie bei Anwendung der gleichen Menge Hefenuclein. Außer dieser phosphorreichen nucleinartigen Substanz war in dem durch Filtration der Verdauungsflüssigkeit gewonnenen Rückstande Hämatin enthalten.

Ein anderes Stück derselben Milz wurde 6 Stunden nach erfolgtem Tode frisch auf den Gehalt an koagulablen und nicht koagulablen Stickstoffsubstanzen untersucht. Dabei wurden in dem aus 100 g frischem Organbrei erhaltenen enteiweißten Extrakt 0,570 g Stickstoff gefunden; das sind etwa 9,5 Proz. des in dieser Milz vorhandenen Stickstoffs. Leider läßt sich nicht angeben, welcher Anteil von diesen 9,5 Proz. auf Stoffe entfällt, die erst postmortal durch fermentative Eiweißspaltung gebildet worden sind.

In gleicher Weise wurde die Milz**) eines gesunden erwachsenen Mannes, der infolge eines Sturzes gestorben war, untersucht.

Vom Gesamtstickstoff (= 1,6145) waren vorhanden in der enteiweißten Verdauungsflüssigkeit 1,1357 g = 70,34 Proz., im

*) In Wirklichkeit ist dieser Wert etwas zu hoch, da im ungelösten Rückstand noch etwas Tyrosin verblieb, dessen Stickstoffgehalt noch abzuziehen wäre.

**) Herr Dr. Reuter, Prosektor am hiesigen Hafenkrankenhause, hatte die Freundlichkeit, das Organ für mich einige Stunden nach dem Tode zu entnehmen, sodaß die Verarbeitung in relativ frischem Zustande erfolgen konnte.

ungelösten Rückstande und den koagulablen Eiweißstoffen 0,4788 g = 29,66 Proz.

In der leukämischen Milz hat demnach innerhalb 4 Wochen eine viel umfangreichere Eiweißspaltung stattgefunden als in der normalen Milz innerhalb 8 Wochen, da bei der ersteren nur noch 1/10, bei der letzteren dagegen noch mehr als 1/4 vom Gesamtstickstoff in Form von unverdauten Substanzen vorhanden war. Indessen ist es fraglich, ob dieser Befund auf eine relative Vermehrung proteolytischen Ferments bezogen werden darf, ob nicht vielmehr die Substanz der leukämischen Milz an sich einer vollständigeren Aufspaltung durch das proteolytische Ferment fähig ist. — Die Verhältnisse lassen sich hier weniger gut übersehen, als in den von Jakoby an normalen und Phosphorlebern ausgeführten analogen Versuchen, bei denen sich eine unzweifelhafte Steigerung der Fermentwirkungen nachweisen ließ.

Leider war ich aus Mangel an dem erforderlichen Material bislang nicht in der Lage, den obigen Befund durch einen zweiten Versuch zu bestätigen.

Analytische Belege.

Verdauungsflüssigkeit aus 230 g leukämischer Milz auf 1 Liter aufgefüllt. Je 5 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 21,19 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 21,39 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 21,29 ccm = 0,029806 g N.

In 1000 ccm daher 5,9612 g N
dazu 0,0150 g N aus den groben Gewebsresten
Summa 5,9762 g N.

Je 10 ccm enteiweißter Verdauungsflüssigkeit (= 1 g Milz) erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 16,61 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 16,71 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 16,66 ccm = 0,02332 g N. Auf die ganze enteiweißte Verdauungsflüssigkeit berechnet: 5,3636 g N.

Enteiweißtes Extrakt der frischen (6 Stunden alten) Milz.

Je 10 ccm (= 2,5 g Milz) erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 10,14 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 10,22 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 10,18 ccm = 0,01425 g N. Auf 100 g Milz berechnet: 0,57 g N.

Normale Milz.

Von der autolysierten flüssigen Masse nach starkem Umschütteln 150 g (= 48,6 g Milz) entnommen, etwas verdünnt, enteiweißt. Filtrat auf 194 ccm gefüllt (4 ccm = 1 g Milz). Filterrückstand nach Kjeldahl zerstört (14 Stdn. erhitzt). Reaktionsprodukt auf 210 ccm verdünnt.

Je 70 ccm, zur Destillation benutzt, erforderten zur Bindung des Ammoniaks a) 11,35 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 11,45 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 11,4 ccm = 0,1596 g N. Stickstoffgehalt der ungelösten und koagulablen Stoffe demnach = 0,4788 g.

Je 5 ccm des Filtrats erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 20,86 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 20,96 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 20,91 ccm = 0,029274 g N. Im gesamten Filtrat = 1,1357 g N.

IV.
Über das Mengenverhältnis zwischen Ammoniakstickstoff und Gesamtstickstoff in durch Autolyse gewonnenen und enteiweißten Verdauungsflüssigkeiten.

Genaue Angaben über die bei der Autolyse abgespaltenen Mengen von Ammoniakstickstoff sind nur spärlich vorhanden. Jacoby[18]), der zuerst die fermentative Ammoniakbildung bei der Autolyse der Hundeleber beobachtete und ferner zeigte, daß in der Leber von mit Phosphor vergifteten Hunden die fermentative Ammoniakbildung bei der Autolyse eine bedeutende Steigerung gegenüber der Norm erfährt, fand bei der Autolyse von normalen Hundelebern für den durch Kochen mit Magnesia bei gewöhnlichem Druck austreibbaren Stickstoff Werte von 5,6 bis 9,4 Proz. des Gesamtstickstoffs.

In einem von mir an leukämischem Blute ausgeführten Versuche [19]) betrug nach der Autolyse der durch Magnesia bei 37° im Vakuum austreibbare Stickstoff 3,04 Proz. vom Gesamtstickstoff.

In zwei von Schütz [20]) mit frischer Hefe ausgeführten Versuchen betrug der durch Kochen mit Magnesia bei gewöhnlichem Druck austreibbare Stickstoff 5,91 und 6,29 Proz. vom Gesamtstickstoff.

Fast den gleichen Wert fand Mochizuki [21]) für den aus reinem Serumalbumin durch Trypsin abspaltbaren und durch Kochen mit Magnesia austreibbaren Anteil, nämlich 5,9 Proz. Mochizuki weist darauf hin, daß von Gümbel bei der Säurespaltung des reinen Serumalbumins ein nur wenig höherer Wert für Ammoniakstickstoff, nämlich 6,50 Proz., gefunden wurde.

Ich habe von den enteiweißten Verdauungsflüssigkeiten, die bei meinen oben beschriebenen Versuchen gewonnen wurden, den im Vakuum bei 37° durch Magnesia austreibbaren Stickstoff bestimmt, ferner in entsprechender Weise eine frische leukämische Milz, sowie eine weitere normale Milz untersucht und dabei folgende Werte erhalten:

Normale Milz, Dauer der Autolyse 2 Monate, $\frac{\text{Ammoniakstickstoff}}{\text{Gesamtstickstoff}} = \frac{5,11}{100}$.

Normale Milz, Dauer der Autolyse 2 Monate, „ $= \frac{4,96}{100}$.

[Dieselbe Milz, frisch untersucht	Ammoniakstickstoff / Gesamtstickstoff	= 3,85 / 100.]
Leukämische Milz, Dauer der Autolyse 1 Monat	"	= 4,96 / 100.
[Dieselbe Milz, frisch untersucht	"	= 2,68 / 100.]
Zwei leukämische Milzen gemischt, Dauer der Autolyse 3 Monate	"	= 5,54 / 100.
Die eine dieser beiden Milzen allein, Dauer der Autolyse 3 Monate	"	= 5,27 / 100.

Da ich die Ammoniakbestimmungen im Vakuum bei 37° ausgeführt habe, solche Verdauungsflüssigkeiten aber nach meinen Erfahrungen dabei etwa 7 bis 15 Proz. Stickstoff weniger liefern als bei Anwendung der Magnesiadestillation bei gewöhnlichem Druck, so müßten obige Zahlen, um sie mit denen der genannten Autoren vergleichen zu können, entsprechend erhöht werden. Tut man das, so ergibt sich eine sehr nahe Übereinstimmung zwischen den von mir bei der Autolyse der Milz, den von Schütz bei der Autolyse der Hefe und den von Mochizuki bei der Trypsinverdauung des Serumalbumins gefundenen Zahlen. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, eine Erklärung für diese Übereinstimmung zu liefern.

Es sei hervorgehoben, daß bei allen meinen Versuchen die Entwicklung von Bakterien aufs sorgfältigste vermieden wurde. Dies wurde erreicht durch häufiges und kräftiges Durchschütteln der reichlich mit Chloroform, zum Teil außerdem noch mit Toluol versetzten Flüssigkeiten. Bei Anwendung von Toluol allein in mäßigen Mengen ist es nach meinen Erfahrungen nicht so leicht, Bakterienentwicklung sicher zu vermeiden. Wie sehr aber gerade die Ammoniakwerte durch Bakterienentwicklung beeinflußt werden, lehrt folgender Versuch:

Die Milz einer gesunden Frau, die am 11. Tage nach einem normalen Wochenbette plötzlich starb, wurde fein zerhackt und

I. 60 g Milzbrei mit 117 g Wasser und 3 g Chloroform in luftdicht verschlossener Flasche in den Brutschrank gestellt.

II. 60 g Milzbrei mit 120 g Wasser aufgekocht, nach dem Erkalten mit 3 g Chloroform versetzt und ebenfalls in den Brutofen gestellt.

III. 60 g Milzbrei mit 120 g Wasser aufgekocht, nach dem Erkalten mit je einer Öse Staphylococcus albus und Bacterium coli*) geimpft, tüchtig durchgeschüttelt und in einer zu 4/5 angefüllten, luftdicht verschlossenen Flasche 18 Stunden bei etwa 21° im Zimmer stehen gelassen. Bei der dann vorgenommenen mikroskopischen Prüfung eines Tropfens

---

*) Die betreffenden Reinkulturen wurden mir von Herrn Prosektor Dr. E. Fraenkel freundlichst zur Verfügung gestellt.

der Flüssigkeit zeigte sich, daß Bakterien in Unmenge vorhanden waren. Die Flüssigkeit roch stark nach Schwefelwasserstoff. Nach kräftigem Umschütteln wurde die Hälfte = 90 g in eine 100 Grammflasche übergefüllt, nach Zusatz von 1,5 ccm Chloroform stark durchgeschüttelt und wohlverschlossen in den Brutofen gestellt. (Zeichen III a.) Die andere Hälfte wurde mit Essigsäure angesäuert, erhitzt, eine halbe Minute im Kochen erhalten, auf $88^1/_2$ g aufgefüllt und nach Zusatz von $1^1/_2$ ccm Chloroform ebenfalls in den Brutofen gestellt. (Zeichen III b.) Beide Proben wurden nach 5 Wochen aus dem Brutschrank genommen, die Portionen I und II dagegen erst nach 6 Wochen. Sämtliche Proben dann in gleicher Weise bei schwach essigsaurer Reaktion aufgekocht, filtriert, die Rückstände ausgewaschen, die Filtrate auf bestimmte Volumina aufgefüllt und darin der Gesamtstickstoff und das Ammoniak bestimmt (nach Schlösing und durch Vakuumdestillation). Die direkt ermittelten Werte sind sämtlich in gleicher Weise umgerechnet auf 100 ccm Flüssigkeit von der gleichen Konzentration, wie sie ursprünglich beim Ansetzen der Proben gewählt war, d. h. ein Teil Milzbrei und zwei Teile Wasser.

In nachstehender Tabelle sind die erhaltenen Werte angeführt.

		I.	II.	III.	
		(autolysiert)	(gekocht)	a.	b.
Gesamtstickstoff		0,6015 Proz.	0,1552 Proz.	0,1457 Proz.	0,1400 Proz.
Ammoniak	nach Schlösing	0,0383 Proz.	0,0101 Proz.	0,0190 Proz.	0,0165 Proz.
	durch Vakuumdestillation	0,0333 Proz.	0,0088 Proz.	0,0165 Proz.	0,0139 Proz.
	durch Kochen mit Magnesia	0,0373 Proz.	0,0119 Proz.	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Tryptophanreaktion		stark positiv	negativ	negativ	negativ

Daraus berechnen sich, wenn man die durch Vakuumdestillation erhaltenen Ammoniakwerte zu Grunde legt, folgende Verhältniszahlen für Ammoniakstickstoff und Gesamtstickstoff.

I.	II.	III.	
		a.	b.
4,63 : 100	4,68 : 100	9,32 : 100	8,2 : 100

Diese Zusammenstellung zeigt, wie sehr der Ammoniakgehalt in eiweißhaltigem Material durch die Entwicklung von Bakterien verändert wird.

Gleichzeitig beweist sie aber auch, wie sehr sich das von Salkowski empfohlene Chloroform zur Abtötung von Bakterien eignet; denn nur dadurch ist es zu erklären, daß in der Flüssig-

keit III., die außerordentlich reich an Bakterien war, nach erfolgtem Chloroformzusatz (s. III. a) nur noch eine relativ unbedeutende Steigerung des Ammoniakgehalts eingetreten ist.

Analytische Belege.

Normale Milz*).

Je 5 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl gebildeten Ammoniaks a) 20,86 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 20,96 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 20,91 ccm = 0,029274 g N. Im gesamten Filtrat = 1,1357 g N.

50 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37 bis 43° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 10,66 ccm $\frac{N}{10}$-H_2SO_4 = 0,014924 g N. Im gesamten Filtrat = 0,058028 g N.

Normale Milz.

Je 10 ccm enteiweißter Verdauungsflüssigkeit erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 19,15 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 19,25 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 19,2 ccm = 0,02688 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit umgerechnet = 0,672 g N.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks a) 1,93 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 1,88 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 1,905 ccm = 0,002667 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,0333 g N.

Dieselbe Milz, frisch enteiweißt.

Je 20 ccm enteiweißte Flüssigkeit erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl gebildeten Ammoniaks a) 6,76 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 6,76 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,00946 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,18923 g N.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 0,26 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,000364 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,00728 g N.

Leukämische Milz.

Je 10 ccm (= 1 g Milz) erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 16,61 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 16,71 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel = 16,66 ccm = 0,02332 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 5,3636 g N.

Je 75 ccm verdünnte Flüssigkeit (= 11,5 g Milz) erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37 bis 42° austreibbaren Ammoniaks a) 9,47 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 9,57 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, c) 9,47 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 9,50 ccm = 0,0133 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,266 g N.

Dieselbe Milz, frisch untersucht.

Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 10,14 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 10,22 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 10,18 ccm = 0,01425 g N. Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,57 g N.

---

*) Vergl. den vorigen Abschnitt.

40 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 1,09 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001526 g N.

Auf die Gesamtflüssigkeit berechnet = 0,01526 g N.

„Zwei leukämische Milzen gemischt", siehe im I. Abschnitt unter Versuchsprotokoll.

Die eine dieser beiden Milzen allein.

Je 5 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 20,6 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 20,55 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 20,6 ccm = 0,02884 g N. Je 100 ccm Flüssigkeit = 0,5768 g N.

50 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 10,86 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,015204 g N. Je 100 ccm Flüssigkeit = 0,030408 g N.

Bakterienversuch.

Zu I. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 25,78 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 25,78 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,036092 g N. Auf das ursprüngliche Extrakt umgerechnet = 0,6015 Proz. N.

20 ccm erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 2,7 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,00459 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt umgerechnet = 0,0383 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 2,35 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,003995 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0333 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des durch Kochen mit Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 2,63 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,004471 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0373 Proz. Ammoniak.

Zu II. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 6,60 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 6,70 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Mittel 6,65 ccm = 0,00931 g N. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,1552 Proz. N.

20 ccm erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 0,71 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001207 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0101 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 0,62 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001054 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0088 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des durch Kochen mit Magnesia ausgetriebenen Ammoniaks 0,84 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001428 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0119 Proz. Ammoniak.

Zu III a) 20 ccm Flüssigkeit erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks 10,41 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,014574 g N. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,1457 g N.

20 ccm erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 1,12 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001904 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0190 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia austreibbaren Ammoniaks 0,97 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001649 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0165 Proz. Ammoniak.

Zu III b) 20 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks 10,00 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,0140 g N. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,1400 Proz. N.

20 ccm erforderten zur Bindung des nach Schlösing ausgetriebenen Ammoniaks 0,97 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001649 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0165 Proz. Ammoniak.

20 ccm erforderten zur Bindung des im Vakuum bei 37° durch Magnesia austreibbaren Ammoniaks 0,82 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,001394 g Ammoniak. Auf das ursprüngliche Extrakt berechnet = 0,0139 Proz. Ammoniak.

V.

Über das proteolytische Ferment des leukämischen Blutes.

Vor einigen Jahren hat Erben[22]) Versuche mitgeteilt, bei denen es ihm gelang, aus leukämischem Blute eine Lösung von eiweißverdauenden Fermenten darzustellen. Erben fällte Plasma-Leukocytengemisch aus leukämischem Blute mit Alkohol und extrahierte nach mehrmonatlichem Stehen den Alkoholniederschlag mit Glycerin. Dieses Glycerinextrakt verdaute nun nach Erben Fibrin gut in 3 promill. Sodalösung, langsam und schlechter, aber doch merklich in 3 promill. Salzsäurelösung.

Unabhängig von Erben habe ich ebenfalls und zwar auf anderem Wege den Nachweis geführt[23]), daß das Blut bei Leukämie ein proteolytisches Ferment enthält und außerdem die durch das Ferment bewirkten Umsetzungen der Eiweißkörper des Blutes untersucht. Kürzlich bot sich mir die Gelegenheit, einige weitere Versuche über die Wirkungsweise des Ferments auszuführen.

Bei einem Fall von lienal-myelogener Leukämie mit enorm vergrößerter Milz wurden 12 Stunden nach dem Tode aus dem Herzen durch Ausdrücken 350 g Blut gewonnen, das sich bei der bakteriologischen Untersuchung steril erwies. 345 g des Blutes wurden sofort mit 690 ccm Wasser, das in kleinen Portionen zugesetzt wurde, durch andauerndes starkes Schütteln gleichmäßig gemischt und davon:

A. 135 g (= 45 g Blut) mit 96 proz. Alkohol auf 1 Liter aufgefüllt und in verschlossener Flasche nach starkem Schütteln stehen lassen.

B. 107,55 g (= 35,85 g Blut) unter Zusatz von etwas Essigsäure aufgekocht und filtriert, das Filtrat mit Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser verrieben und filtriert. Die Flüssigkeit gab intensive Biuretreaktion, Albumosen waren also reichlich vorhanden.

C I. 107,55 g (= 35,85 g Blut) wurden mit Wasser verdünnt, unter Zusatz von etwas Essigsäure aufgekocht und nach Zusatz von Chloroform in den Brutofen gestellt.

C II. 225 g (= 75 g Blut) wurden nach Zusatz von 5 ccm Chloroform und 10 ccm Toluol in den Brutofen gestellt.

C III. 225 g (= 75 g Blut) wurden mit 2,25 g kristallisierter Soda, 5 ccm Chloroform und 10 ccm Toluol versetzt und in den Brutofen gestellt.

C IV. 225 g (= 75 g Blut) wurden mit 4,5 ccm 25 proz. Salzsäure, 5 ccm Chloroform und 10 ccm Toluol versetzt und in den Brutofen gestellt.

Nach 6 Wochen langem Stehen wurde die Portion A filtriert, der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Hälfte des Niederschlags, entsprechend 22,5 g Blut wurde mit 80 ccm Glycerin verrieben und 24 Stunden stehen gelassen, mit 80 ccm Wasser verdünnt und durch ein gehärtetes Filter filtriert. 90 ccm des Filtrats, entsprechend etwa 13,5 g Blut, wurden mit der achtfachen Menge Alkohol unter Zusatz von Äther gefällt. Nach 24 Stunden wurde der geringe flockige Niederschlag abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und mit 22 ccm Wasser verrieben, wobei das meiste in Lösung ging. Vom Filtrat wurden

a) 10 ccm mit 20 ccm gekochter Milch und 0,2 g kristallisierter Soda unter Zusatz von Chloroform in den Brutofen gestellt.

b) 10 ccm aufgekocht, mit 20 ccm gekochter Milch und 0,2 g kristallisierter Soda unter Zusatz von Chloroform in den Brutofen gestellt.

Nach 48 Stunden wurden beide Proben mit Essigsäure angesäuert, wobei in „a“) keine, in „b“) dagegen reichliche Kaseinausscheidung eintrat. Beide Proben wurden nun aufgekocht und filtriert. Das Filtrat von „a“ gab intensive (purpurviolette) Biuretprobe, das Filtrat von „b“ nur sehr geringe bläuliche Färbung.

Aus dem Rest des Glycerinauszuges wurde nochmals in gleicher Weise eine Fermentlösung dargestellt und in entsprechender Weise sowohl unter Anwendung von gekochter Milch wie auch unter Benutzung von frischem Rindsfibrin auf das Vorhandensein eines bei Gegenwart von 0,2 Proz. Salzsäure wirksamen Ferments geprüft, aber mit negativem Ergebnis.

Es ließ sich demnach aus dem Blute eine Fermentlösung gewinnen, die bei mit Soda alkalisch gemachter Reaktion Kasein gut verdaute, während ich mich von der Anwesenheit eines nach Art des Pepsins bei Gegenwart von Salzsäure wirksamen Ferments nicht überzeugen konnte.

Die Portionen C I, II, III, IV wurden nach 7 Wochen langem Stehen im Brutschrank enteiweißt und in den eiweißfreien Flüssigkeiten nach Kjeldahl der Gesamtstickstoff und der Stickstoff des Phosphorwolframsäureniederschlags bestimmt und der Stickstoffgehalt der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen berechnet. Die Enteiweißung geschah bei den einzelnen Proben folgendermaßen:

Die schon vor der Digestion mit Essigsäure aufgekochte Portion C I wurde nochmals aufgekocht, heiß filtriert und der Rückstand (unter Be-

nutzung eines Heißwassertrichters) ausgewaschen. Portion C II wurde bei schwach saurer Reaktion aufgekocht, heiß filtriert und weiter behandelt, wie I. — Portion C III bildete vor der Digestion infolge des Zusatzes von 1 Proz. Soda eine dickschleimige Masse. Nach der Digestion war die Masse dünnflüssiger, aber noch immer etwas schleimig. Sie wurde mit Essigsäure angesäuert, aufgekocht und weiter behandelt, wie I. Das Filtrieren und Auswaschen war aber bei dieser Portion infolge der eigenartigen physikalischen Beschaffenheit mit Schwierigkeiten verknüpft, sodaß wahrscheinlich noch ein kleiner Teil nicht koagulabler Stickstoffsubstanzen im Niederschlag zurückgeblieben ist. Da das Filtrat und Waschwasser mehr als 500 ccm betrug, wurde auf 500 ccm eingedampft. Die Reaktion war dabei schwach sauer, sodaß Verlust an Stickstoff nicht eintreten konnte. —

Portion C IV wurde mit Soda neutralisiert, dann mit Essigsäure sehr schwach angesäuert, aufgekocht und weiter wie I behandelt. Da das Filtrat durch Zusatz von etwas Essigsäure in der Hitze noch getrübt wurde, wurde es nach weiterem Zusatz von Essigsäure nochmals aufgekocht, filtriert und das Filter ausgewaschen.

Zum Schutze gegen Fäulnis wurden sämtliche Flüssigkeiten in gut verschließbare Flaschen gefüllt und mit 1 Proz. Chloroform versetzt. Die Menge betrug bei allen vier Portionen je 500 ccm. Der Kürze halber gebe ich die gewonnenen Resultate tabellarisch wieder. Die direkt erhaltenen Werte sind auf 100 g Blut umgerechnet.

100 g Blut ergaben in Form von nicht koagulablen Substanzen:

Nach dem Aufkochen mit Essigsäure und darauf folgender Digestion. (C I.)	0,893 g N, davon durch Phosphorwolframsäure fällbar 0,656 g N
Bei einfacher Digestion ohne Zusatz. (C II.)	2,226 g N, davon durch Phosphorwolframsäure fällbar 0,658 g N
Bei Digestion unter Zusatz von 1 Proz. Soda. (C III.)	2,104 g N, davon durch Phosphorwolframsäure fällbar 0,618 g N
Bei Digestion unter Zusatz von 0,5 Proz. Salzsäure. (C IV.)	0,868 g N, davon durch Phosphorwolframsäure fällbar 0,641 g N

Die prozentische Stickstoffverteilung ergibt folgende Tabelle:

	Durch Phosphorwolframsäure	
	fällbar	nicht fällbar
C I	73,46 Proz.	26,54 Proz.
C II	29,56 Proz.	70,44 Proz.
C III	29,37 Proz.	70,63 Proz.
C IV	73,85 Proz.	26,15 Proz.

Die Biuretreaktion war bei CI und CIV ziemlich stark, bei CII und CIII negativ.

Auch aus diesem Versuche ergibt sich kein Hinweis auf das Vorhandensein eines bei Gegenwart von Salzsäure wirksamen proteolytischen Ferments. Dagegen beweist der Versuch, daß bei Anwesenheit von 1 Proz. Soda eine etwa ebenso starke fermentative Eiweißspaltung stattfindet wie ohne Zusatz. Der Einwand, daß die nachgewiesene Eiweißspaltung als Sodawirkung aufzufassen sei, wird widerlegt durch den oben angeführten Versuch mit der aus dem Blute hergestellten Fermentlösung.

Es erscheint zunächst auffällig, daß die absoluten Mengen des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs in allen vier Portionen nahezu gleich sind. Der durch Phosphorwolframsäure fällbare Anteil besteht aber in den einzelnen Proben aus verschiedenartigen Substanzgemischen. Denn der verschiedene Ausfall der Biuretreaktion deutet an, daß in C II und C III Albumosen höchstens in Spuren vorhanden waren, C I und C II dagegen erhebliche Mengen von diesen Substanzen enthielten. Der daneben bestehende beträchtliche Mehrgehalt an durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stoffen in den Portionen C II und C III zeigt, daß unter dem Einfluß des vorhandenen proteolytischen Ferments die ursprünglich ziemlich reichlich vorhandenen Albumosen eine weitere Aufspaltung unter Bildung von Aminosäuren erfahren haben. Anderseits treten neue, durch Phosphorwolframsäure fällbare Stoffe auf, unter denen ich kürzlich das Lysin nachgewiesen habe. —

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die relativen Mengen von durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren stickstoffhaltigen Stoffen bei den durch Autolyse der leukämischen Milz und des leukämischen Blutes erhaltenen Verdauungsflüssigkeiten fast gleich sind, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

	Von 100 Teilen Gesamtstickstoff sind enthalten im	
	Phosphorwolframsäureniederschlag	Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag
Milz	28,54	71,46
Blut	29,56	70,44

Hinsichtlich des zeitlichen Auftretens und Verschwindens der albumoseartigen Substanzen ergibt sich aus der früheren und der vorstehenden Beobachtung folgendes:

In dem 4 Stunden nach dem Tode entnommenen Blute sind primäre und sekundäre Albumosen ziemlich reichlich vorhanden, während Pepton (Kühne) nicht nachweisbar ist. Nach dreiwöchentlicher Autolyse sind primäre Albumosen nur noch in geringer Menge, sekundäre Albumosen dagegen noch reichlich vorhanden, auch Pepton (Kühne) ist jetzt nachweisbar. Nach

sieben Wochen ist die Biuretreaktion nicht mehr positiv, albumoseartige Substanzen können demnach höchstens noch in geringer Menge vorhanden sein.

In dieser Untersuchung ist gezeigt worden, daß bei lienalmyelogener Leukämie im Blute ein proteolytisches Ferment vorhanden ist, dessen Wirksamkeit durch Zusatz von 1 Proz. kristallisierter Soda keine nachweisbare Schwächung erfährt, sich also in dieser Beziehung wie Trypsin verhält, ferner daß ein, ebenfalls von Erben aufgefundenes, nach Art des Pepsins bei Gegenwart von Salzsäure wirksames proteolytisches Ferment jedenfalls nicht in allen Fällen von myelogener Leukämie nachzuweisen ist.

Analytische Belege.

Zu CI. Je 20 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 9,20 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 9,10 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 9,15 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 638,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,893 g Gesamt-N.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus je 25 ccm Flüssigkeit erfordert zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 8,35 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 8,45 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 8,40 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 468,6 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,656 g N.

Zu CII. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 23,84 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 23,84 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,033376 g N. Auf 667 ccm = 100 g Blut umgerechnet 2,226 g Gesamt-N.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus je 20 ccm Flüssigkeit erforderte zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 14,15 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 14,05 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 14,1 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 470,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,658 g N.

Zu CIII. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 22,53 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 22,53 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4. Auf 100 g Blut umgerechnet = 1503 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 2,104 g Gesamt-N.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus je 20 ccm erforderte zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 13,14 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 13,34 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 13,24 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 441,5 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = 0,618 g N.

Zu CIV. Je 10 ccm erforderten zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 9,2 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4, b) 9,4 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 9,3 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 620,3 ccm = 0,868 g Gesamt-N.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus je 20 ccm erforderte zur Bindung des nach Kjeldahl entwickelten Ammoniaks a) 13,84 ccm $\frac{N}{10}$-H_2SO_4, b) 13,64 ccm $\frac{n}{10}$-H_2SO_4 = Mittel 13,74 ccm. Auf 100 g Blut umgerechnet = 458,2 ccm = 0,641 g N.

Literaturverzeichnis.

1) Schumm, Diese Beiträge **3**, 576 (1903).

2) Hausmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 91; **29**, 136. — Gümbel, Diese Beiträge **5**, 297 (1904). — Schöndorff, Pflügers Archiv **62** u. **74**. — Landau, Deutsches Archiv f. Klin. Medizin **79**.

3) cfr. Landau, loc. cit.

4) In den bekannten Arbeiten von Kossel und Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chemie.

5) In den bekannten Arbeiten von E. Fischer und seinen Schülern. Zeitschr. f. physiol. Chemie.

6) Krüger und Salomon, Zeitschr. f. physiol. Chemie **26**, 373.

7) Jones und Winternitz, Zeitschr. f. physiol. Chemie **44**, 1.

8) Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 114.

9) Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie **29**, 334.

10) Kossel und Dakin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **41**, 321; **42**, 181.

11) Salkowski, Deutsche med. Wochenschrift 1888, Nr. 16.

12) Nencki und Zaleski, Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 193.

13) Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 159; **41**, 332; **44**, 381.

14) Habermann und Ehrenfeldt, Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 18.

15) Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chemie **38**, 111.

16) Kutscher und Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 473.

17) Skraup, Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 274.

18) Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 149 (1900).

19) Schumm, Diese Beiträge **4**, 442 (1903).

20) Schütz, Diese Beiträge **3**, 437 u. 438 (1903).

21) Mochizuki, Diese Beiträge **1**, 44 (1901).

22) Erben, Wiener klin. Wochenschrift **15**, 276 (1902). — Zeitschr. f. Heilkunde **24**, 70 (1903). — Diese Beiträge **5**, 461 (1904).

23) Schumm, Diese Beiträge **4**, 442 (1903); **5**, 583 (1904).

XIII.

Die Gesetze der Hippursäuresynthese.

(Zugleich ein Beitrag zur Frage der Stellung des Glykokolls im Stoffwechsel.)

Von Dr. **Wilhelm Wiechowski,** Assistent.

Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität in Prag.
II. Reihe.

Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

Inhaltsübersicht.

I. Einleitung.

Die Tatsache, daß bei der Hydrolyse der Eiweißkörper in vitro α-Aminosäuren in größtem Umfange entstehen, hat zu der naheliegenden Annahme geführt, daß auch im tierischen Organismus beim intermediären Abbau der Eiweißkörper Aminosäuren gebildet werden.

Sowohl bei der Spaltung des als Energiequelle dienenden Nahrungseiweißes als bei der der Elimination verbrauchter Gewebebestandteile vorausgehenden Auflösung des Organeiweißes könnten die in allem Lebenden wirksamen hydrolytischen Prozesse — wie die Wirkung der Verdauungsfermente und die Autolyse extra corpus — zu einer der Oxydation vorausgehenden Zerlegung in α-Aminosäuren führen, welche sodann die unmittelbare Vorstufe des ausgeschiedenen

Harnstoffes darstellen würden. Die Möglichkeit eines solchen Verhaltens beweist zunächst das Schicksal von in den Organismus eingeführten α-Aminosäuren, die, soweit die zahlreichen Untersuchungen reichen, ausnahmslos glatt in Harnstoff übergehen. [Nencki und Schultzen[90]), Salkowski[68]), Knieriem[36], [37]), R. Cohn[24]), Abderhalden und Bergell[1]), Stolte[96]), Blum[17]), Salaskin und Kowalewsky[67])], wobei möglicherweise eine Oxydation zu Ammoniak (Salaskin und Kowalewsky) bzw. eine Desamidierung [Lang[44]), Neuberg und Langstein[55])] eine vermittelnde Rolle spielt. Darüber hinaus haben viele Untersuchungen an Menschen und Tieren gezeigt, daß der tierische Organismus im normalen und pathologischen Zustande Aminosäuren bildet und unter Umständen auch ausscheidet. Zunächst wird, abgesehen von der Ausscheidung von Glykokoll und Taurin mit der Galle, im normalen Harne stets ein geringer Bruchteil des Stickstoffes in einer Form ausgeschieden, welche auf Aminosäuren schließen läßt. Ferner ist seit langem bekannt, daß manche aromatische Körper im Organismus eine Synthese mit Aminosäuren eingehen (mit Cystin, Glykokoll, Ornithin; auch die Bildung von Uraminosäuren kann hierher gerechnet werden, wenn man deren Synthese als solche mit Carbaminsäure [Aminoameisensäure] auffaßt). Schließlich ist die alte Beobachtung der Ausscheidung von Leucin und Tyrosin im Harne bei akuter gelber Leberatrophie in neuester Zeit durch den Nachweis großer Aminosäuremengen im Blute eines Falles dieser Erkrankung [Neuberg und Richter[57]), v. Bergmann[13])], sowie durch die Auffindung verschiedener Aminosäuren im Harne von Gichtkranken [Ignatowski[30])] und von mit Phosphor vergifteten Kaninchen [Abderhalden und Bergell[2])] erweitert worden, woran sich die in letzter Zeit wieder eingehend studierte Cystinurie bzw. Cystindiathese [Neuberg und A. Löwy[56])] schließt. Wenn es sonach nicht nur möglich, sondern sehr wahrscheinlich ist, daß der normale Organismus stets Aminosäuren bildet, so hängt es wesentlich von dem noch unbekannten Umfange dieser Bildung bzw. von deren Zusammenhang mit der normalen Harnstoffbildung ab, ob wir anzunehmen haben, daß der Eiweißabbau hauptsächlich und regelmäßig über die intermediäre Bildung von Aminosäuren seinen Weg nimmt. Hierbei besteht noch die Möglichkeit, daß im intermediären Stoffwechsel die Aminosäurenbildung aus Eiweiß in anderer Weise verläuft als bei der Säurespaltung in vitro, bzw. daß primär abgespaltene Aminosäuren im weiteren Verlaufe des Stoffwechsels in andere übergehen können. Die Auffindung des nur bei der Säurehydrolyse des

Leims in größerer Menge gefundenen Glykokolls im Harne von Gichtikern [Ignatowski[30])] und im Kaninchenharne bei experimenteller Phosphorintoxikation [Abderhalden und Bergell[2])] sowie die von Neuberg und A. Löwy[56]) jüngst mitgeteilte Tatsache, daß ihr Cystinuriker eingegebenes Leucin, Tyrosin und Glutaminsäure nicht zu zerstören vermochte, scheint neuerlich davor zu warnen, sich den intermediären Eiweißabbau vollkommen identisch mit der Säurehydrolyse extra corpus vorzustellen.

Ein Aufschluß über die Rolle, welche die Aminosäuren im intermediären Stoffwechsel spielen — genauer ausgedrückt ein Aufschluß über die Menge der normaler Weise gebildeten Aminosäuren und ihre Beziehungen zur Harnstoffbildung — dürfte heutigen Tages kaum anders als auf dem Wege des pharmakologischen Experimentes zu gewinnen sein; durch planmäßige Vergiftung mit Substanzen, welche mit Aminosäuren vom Körper unangreifbare synthetische Verbindungen eingehen. Von Aminosäuresynthesen sind bis nun nur die des Cystins und Glykokolls bekannt. Die des letzteren mit Benzoesäure zu Hippursäure ist zuerst von Wiener[104, 105, 106]), dann von Parker und Lusk[59]) und R. Cohn[21, 22, 23]) zur Bestimmung der im Körper gebildeten Glykokollmenge verwendet worden, in der Absicht, um festzustellen, in welchem Umfange der Eiweißstoffwechsel Glykokoll liefert. Wiener und Cohn legen der Diskussion ihrer Versuchsresultate das von Wiener mitgeteilte Maximum der Glykokollausfuhr pro Kilo Kaninchen nach einmaliger Benzoesäurezufuhr (= 0,49 g Glykokoll) zugrunde, während Parker und Lusk am Hungerkaninchen aus dem Verhältnis von Hippursäurestickstoff und Gesamtstickstoff den Umfang der Glykokollbildung beim Eiweißabbau berechnen. Die Ergebnisse dieser Autoren sind sehr different. Wiener findet bei seiner Versuchsanordnung, daß die Tiere stets nur wenig Glykokoll zur Verfügung haben; wogegen Cohn mit einer anderen Versuchsanordnung zeigt, daß die verfügbare Glykokollmenge doch recht erheblich sein müsse. Parker und Lusk gelangen zwar zu dem zahlenmäßigen Ergebnis, daß der Eiweißstoffwechsel des Hungerkaninchens 3 bis 4 Proz. Glykokoll entstehen lasse; sie versäumen es aber, die auch in ihren Versuchen gegebene stoffwechselsteigernde Wirkung der Benzoesäure, welche das zur Berechnung herangezogene Verhältnis zwischen Hippursäurestickstoff und Gesamtstickstoff beeinflussen kann, zu berücksichtigen.

Man muß hiernach die Frage nach dem Umfange der Glykokollbildung im Organismus und ihrer Beziehungen

zum Harnstoff einerseits, und zum Schicksale der Aminosäuren andererseits, als eine offene bezeichnen.

Die Gegensätzlichkeit der bisher geförderten Ergebnisse läßt sich zum Teile auch der Tatsache zuschreiben, daß bei Darreichung von Benzoesäure zumeist neben der beabsichtigten Bindung intermediären Glykokolls eine unerwünschte Vergiftung des Organismus veranlaßt wird, welche insbesondere durch die Stoffwechselsteigerung, aber auch wegen der antifermentativen Wirkung der Benzoesäure die Versuchsergebnisse in unübersehbarer Weise beeinflussen kann. Diese Nachteile lassen sich aber zur Zeit nicht völlig vermeiden, da keine Substanz bekannt ist, welche bei geringerer Giftigkeit in gleichem Umfange mit Glykokoll gepaart würde wie Benzoesäure. Es bleibt also nichts anderes übrig, als auf dem einmal eingeschlagenen Wege weiter zu gehen und durch ein möglichst genaues Studium die Gesetze, welche die Glykokollsynthese der Benzoesäure im Organismus beherrschen, festzustellen und mit dieser Erkenntnis ausgerüstet an die Erforschung der Rolle, welche dem Glykokoll im Stoffwechsel angewiesen ist, heranzutreten. Zu diesem Zwecke habe ich neuerlich die Hippursäuresynthese, namentlich nach ihrem quantitativen Ablaufe und in ihren Beziehungen zur Gesamtstickstoffausscheidung am Kaninchen studiert.

Es konnte nicht fehlen, daß im Laufe der Versuche auch Beobachtungen gemacht wurden, die zwar mit dem Plane der Untersuchung nicht in unmittelbarem Zusammenhang standen, aber Tatsachen betreffen, die beim Experimentieren mit Benzoesäure am Tiere nicht außer acht gelassen werden dürfen. Es ist daher notwendig, die Gesamtheit der in der Pharmakologie der Benzoesäure gemachten Beobachtungen zu besprechen, soweit sie nicht die Wirkungen auf Zentralnervensystem, Herz und Atmung und die allgemeinen Vergiftungserscheinungen betreffen (über diese vgl. Kobert, Schmidts Jahrb. 1880). Hierbei kommen vorzugsweise Beobachtungen an Kaninchen bzw. Pflanzenfressern in Betracht, weil in deren Körper eine Wiederzersetzung einmal gebildeter Hippursäure de norma nicht vorkommt, was naturgemäß die Grundbedingung für die Verwendung der Benzoesäure-Intoxikation zur Bestimmung intermediären Glykokolls ist.

II. Die Pharmakologie der Benzoesäure.

A. Tödliche Dosis, Wirkung auf Darm, Stoffwechsel und Diurese.

Die tödliche Benzoesäuremenge für Kaninchen wird von Kobert[40]) mit höchstens 2,0 g, von Wiener[101]) mit 1,7 g pro Kilo

Körpergewicht angegeben. Diese Zahlen beziehen sich auf die Darreichung per os; da ich in allen meinen Versuchen, um von den wechselnden Resorptionsverhältnissen im Magendarm unabhängig zu sein, die Benzoesäure subkutan einführte, hielt ich es für notwendig, für diese Applikationsweise die Dosis letalis noch einmal zu ermitteln. Das Ergebnis einer zu diesem Zwecke angestellten Versuchsreihe gibt Tabelle I wieder.

Tabelle I.

Gewicht des Tieres in g	Subkutan als Na-Salz gereichte Benzoesäure pro Kilo in g	In den ersten 24 Stunden	In den zweiten 24 Stunden
1650	0,72	0	0
1500	0,85	0	0
1930	1,0	Diarrhoe	
1650	1,31	Diarrhoe	normal
1420	1,44	Diarrhoe	normal
1470	1,51	mäßige Diarrhoe	normal
1200	1,56	0	0
1350	1,60	mäßige Diarrhoe	
1350	1,60	mäßige Diarrhoe	
1380	1,61	Diarrhoe	Tod
1200	1,67	0	0
1450	1,67	mäßige Diarrhoe	0
1900	1,74	Tod	
1700	1,74	Tod	
1500	1,79	Diarrhoe — Tod	

Auch für die subkutane Darreichung beträgt somit die letale Dosis Benzoesäure annähernd 1,7 ‰ des Körpergewichts, doch ist sie, wie ersichtlich, nicht ganz präzis festzustellen. Einmal erfolgte bereits bei 1,61 ‰ der Tod, während Wiener[104]) einmal sogar bei 1,99 ‰ per os dargereichter Benzoesäure noch ein Überleben des betreffenden Kaninchens beobachtet hat. Diese Unsicherheit läßt es unzulässig erscheinen, aus der Wirkungslosigkeit der einfachen Dosis letalis nach Zufuhr einer Substanz mit Bestimmtheit auf eine Entgiftung infolge derselben zu schließen,

wie es Wiener[104]) und Cohn[21]) gelegentlich der Diskussion ihrer Versuche mit Benzoesäure + Leim, Kasein, Leucin und Harnsäure nebenbei getan haben. Die nach stöchiometrischen Anschauungen durchaus gerechtfertigte pharmakologische Gepflogenheit, die Giftdosierung und Berechnung zum Körpergewicht in ein Verhältnis zu setzen, führt stets nur zu Näherungswerten oder Mittelzahlen, denen eine absolute Giltigkeit kaum zukommt. Der Grund hiefür liegt offenbar darin, daß es unmöglich ist, die reagierende Masse des lebenden Tieres zu messen. Wie E. Voit[101]) jüngst gezeigt hat, läßt das Lebendgewicht der Tiere einer Art keinen Schluß auf deren Organgewichte zu, wogegen allerdings das „Reingewicht“ (= Gewicht ohne Haare, Fett und Magendarminhalt) innerhalb einer Tierart in einer konstanten Beziehung zu den Organgewichten steht. Der Wassergehalt der Tiere ist, wie sich aus den Voitschen Zahlen ergibt, ohne Einfluß auf diese Verhältnisse, wohl aber der Ernährungszustand, indem bei Unterernährung die Verhältniszahlen inkonstant werden. Hiernach leistet die Dosierung von Giften pro Kilo nicht einmal am selben Tiere Gewähr für eine einwandfreie Vergleichsunterlage, sobald der Ernährungszustand wechselt, und a fortiori müssen alle Schlüsse unsicher sein, welche auf einer Berechnung chemisch-physiologischer Versuchsresultate pro Kilo verschiedener Individuen aufgebaut sind; jedenfalls besonders dann, wenn es sich um geringe Schwankungen handelt.

Wie aus Tabelle I zu entnehmen ist, zeigten fast alle Tiere, welche mehr als ungefähr 0,8 Benzoesäure pro Kilo erhalten hatten, mehr oder minder flüssige Stuhlentleerungen. Diarrhoe scheint sonach nächst der Diurese und Stoffwechselsteigerung eines der ersten Vergiftungssymptome (selbst bei subkutaner Darreichung) zu sein. Eine Beeinflussung des Darmes ist möglicherweise auch bei der flüssige Defäkation noch nicht bewirkenden Dosis von 0,8 g Benzoesäure pro Kilo Tier gegeben. Es fiel oft auf, daß die Tiere an den Benzoesäuretagen viel mehr Kot entleerten als sonst. Einige in dieser Richtung angestellte Wägungen der 24stündigen, lufttrockenen Kotmenge scheinen diese Beobachtung zu bestätigen (vgl. als Beispiel Tab. II). Entscheidende Bedeutung kommt allerdings diesen Wägungen für die Frage der Darmwirkung der Benzoesäure insolange nicht zu, als die Gesetzmäßigkeit des Umfanges der Kotentleerung bei Kaninchen nicht bekannt ist; doch dürften die Pflanzenfresser geeignete Objekte sein mit der Wage die Darmperistalik zu beurteilen, da sie in ihrem Blinddarm ein fast unerschöpfliches Kotreservoir besitzen, dessen kontinuierliche oder periodische mehr oder minder von der

Nahrungsaufnahme unabhängige Entleerung sehr wohl zu der Intensität der Darmbewegung entsprechenden Kotgewichten führen kann. Für eine Beeinflussung des Magendarmtraktes durch die Benzoesäure sprechen übrigens auch die beim Menschen nach deren Genuß oft beobachtete Brechneigung und selbst blutiges Erbrechen, sowie die von Kobert[40]) beobachteten Hämorrhagien im Magendarmtrakt nach tödlicher Intoxikation und der gleichfalls von Kobert[40]) mitgeteilte Übergang von Benzoesäure in den Mundspeichel beim Hunde.

Die Beziehung der Benzoesäure zum Darm ist für das Schicksal derselben im Organismus nicht unwichtig, da, wie ich beobachtet habe, eine Aussscheidung derselben mit dem diarrhoischen Stuhle erfolgen kann (vgl. S. 235).

Tabelle II.

Kaninchen Nr. XIV.

Datum	Gewicht in g	In 24 Stunden				Bemerkungen
		Kot lufttrocken in g	Harnmenge in ccm	Gesamtharnstickstoff	Hafer, verzehrt in g	
10. III. 04	2090					
11. III.	2090	3	36	0,99	77	1,64 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
12. III.	1970	27	150	1,36	10	
13. III.	1940	15	44	1,17	41	
14. III.	1950	5	40	1,11	77	1,64 Benzoesäure + 0,5 Cholsäure subkutan
15. III.	1850	45	101	1,23	2	
16. III.	1850	5	45	1,24	24	
17. III.	1815	3	47	1,13	39	
18. III.	1850	2	45	1,08	53	

Von großer Bedeutung für die Bestimmung intermediären Glykokolls mittels Benzoesäure ist die stoffwechselsteigernde Wirkung der letzteren. Die ersten Mitteilungen hierüber macht Salkowski[69]). Bei einem Kaninchen beobachtete er nach Benzoesäurefütterung eine Steigerung der Stickstoffausscheidung im Harn von 1,0 auf 1,7 g bei gleichzeitiger Vermehrung der Gesamtschwefelausscheidung, sodaß das Verhältnis S : N keine Änderung erfuhr. Später wurden in dieser Richtung von Virchow[100]) und Kuma-

gawa[41]) Versuche am Hunde mit wechselndem Erfolge unternommen, auch Noël-Paton[58]) berichtet über gleiche Beobachtungen. Die Ergebnisse von Virchow und Kumugawa im Zusammenhange mit noch anderen einschlägigen Beobachtungen faßt Salkowski[77]) dahin zusammen: „daß die Benzoesäure und Derivate derselben, welche in Benzoesäure übergehen, keine konstante Wirkung auf den Eiweißzerfall haben, diese vielmehr, abgesehen von dem Ernährungszustande, von der Individualität des Tieres abhängt". An anderer Stelle derselben Arbeit gelangt dann Salkowski zu der Ansicht, daß die stoffwechselsteigernde Wirkung beim Hunde mit dem Umfange der Hippursäuresynthese zusammenhänge, derart, daß Tiere, die nur geringe Mengen Benzoesäure durch Paarung entgiften können, mit einer deutlichen Vermehrung der Stickstoffausscheidung reagieren; während bei Tieren, deren Paarungsvermögen ein bedeutendes ist, die Benzoesäure keinen erheblichen Stoffzerfall veranlasse. Die individuellen Verschiedenheiten lägen in einer individuell verschiedenen Größe der synthetischen Kraft, da man die zur Verfügung stehenden Glykokollmengen bei den in Frage kommenden Hunden im Stickstoffgleichgewicht als nur unwesentlich schwankend annehmen könne. An Kaninchen liegen ferner Stickstoffbestimmungen nach Benzoesäurezufuhr vor von Wiener[104]), von Parker und Lusk[59]) und Přibram[63]). Dieselben ergeben eine deutliche Steigerung der Stickstoffausfuhr im Harne bei Benzoësäurevergiftung, nur in Tabelle III bei Parker und Lusk ist ein anderes Verhältnis zu konstatieren; hier sinkt die Stickstoffausscheidung unter dem gleichzeitigen Einflusse des Hungers und der Benzoesäure von 0,9 auf 0,3; in allen anderen ihrer Versuche ist jedoch eine bedeutende Stoffwechselsteigerung vorhanden.

Meine eigenen Versuche bestätigen zunächst im allgemeinen die bedeutende Zunahme der Stickstoffausscheidung nach Benzoesäurezufuhr beim Kaninchen, wie aus der Tabelle hervorgeht. (Siehe Tabelle III auf Seite 212.) Sie tritt jedoch, in Übereinstimmung mit den Befunden bei Přibram[63]), nicht immer in den der Benzoesäurezufuhr folgenden 24 Stunden auf, sondern häufig erst in den zweiten 24 Stunden, zu einer Zeit, da, wie unten ausführlich bewiesen wird, weder Benzoesäure noch Hippursäure mehr in Zirkulation sind (Nr. IV, VIII, X). Nicht selten beobachtet man sogar am ersten Tage eine bedeutende Abnahme der Stickstoffausscheidung im Harne (Nr. III, VI, VII). Die Mehrausscheidung von Stickstoff dauert bei der durchgehends angewandten Dosis von 0,8 g pro Kilo meist nur 24 Stunden,

gelegentlich jedoch auch länger an. In Bezug auf diese Stoffwechselwirkung scheint ein Versuch (Tabelle IV) von Interesse, in welchem längere Zeit hindurch täglich Benzoesäure gereicht wurde und die anfängliche Steigerung des Stoffwechsels bald abnahm und fast verschwand; er steht in guter Übereinstimmung mit einem von Salkowski[71]) mitgeteilten Versuche am Hunde, welcher bei täglicher Benzoesäurezufuhr nur am ersten Tage eine Mehrausscheidung von Stickstoff im Harne zeigte. Mein Tier hat bis zum Schlusse des Versuches in den letzten Tagen allerdings wenig gefressen. Dieser Versuch widerlegt übrigens die von Parker und Lusk aufgestellte, durch deren eigene Versuche aber nicht gestützte Behauptung, daß die Größe der Hippursäureausscheidung und Gesamtstickstoffausscheidung parallel laufen.

Tabelle III.

Stickstoffausscheidung in g.

Nr. des Versuchstieres	1. Tag	2. Tag		3. Tag	4. Tag	5. Tag		6. Tag	7. Tag
I.	0,94	0,95	0,8 g Benzoesäure pro Kilo subkutan	1,18			0,8 g Benzoesäure pro Kilo subkutan		
II.		0,86		1,28					
III.		0,83		0,65				1,03	
IV.		0,60		0,60	0,82			1,06	1,26
V.		0,68		0,69					
VI.		0,98		0,52					
VII.		0,71		0,60					
VIII.		0,86			1,13	0,79			
X.		0,85		0,83	1,19	0,92			
XI.		1,00		1,63	1,12				
XIV.		0,99		1,36	1,16	1,11			
XVI.	0,65	0,72		1,21					

Bei allen Versuchen, welche auf die Feststellung einer Änderung des Stickstoffwechsels beim Kaninchen abzielen, muß man sich gegenwärtig halten, daß die Stickstoffausscheidung auch bei durchaus regelmäßig ernährten Kaninchen nicht immer konstant ist; daß vielmehr nicht selten Tiere gefunden werden, deren 24stündige Harnstickstoffmengen ganz bedeutende Schwankungen aufweisen. Solche Tiere sind von den Versuchen auszuschließen.

Tabelle IV.
Kaninchen Nr. XVI.

Datum	Gewicht in g	In 24 Stunden Harnmenge in ccm	Gesamtstickstoff in g	verzehrter Hafer in g	Benzoesäurezufuhr als Na-Salz subkutan = 0,8 pro Kilo in 4 % Lösung
17. IV. 1904	2000	36		93	
18. IV.	2010	34	0,62	82	
19. IV.	2010	42	0,65	63	
20. IV.	1970	26*	0,72	29	1,57 g
21. IV.	1870	100	1,21	29	1,49 „
22. IV.	1790	90	1,20	39	1,43 „
23. IV.	1820	85	1,08	73	1,46 „
24. IV.	1800	70	0,71	72	1,44 „
25. IV.	1760	70	0,73	58	1,41 „
26. IV.	1700	80	0,84	36	1,34 „
27. IV.	1620	70	0,81	15	1,30 „
28. IV.	1530	93	0,89	8	
29. IV.	1450	40 (Eiweiß)	?	0	
30. IV.	Tod				

In Tabelle V ist die relative Steigerung der Stickstoffausfuhr mit den korrespondierenden Werten für das nach 0,8 g Benzoesäure p. K. ausgeschiedene Glykokoll zusammengestellt; sie beweist, daß die Annahme von Salkowski[71]), wonach die geringe Hippursäurebildung eine heftigere Stoffwechselwirkung zur Folge habe, für das Kaninchen nicht giltig ist.

Tabelle V.

Tier Nr.	Zunahme der Stickstoffausscheidung in Proz.	Glykokollausscheidung pro Kilo-Tier in g	Verabreichte Benzoesäure als Na-Salz subkutan = 0,8 pro Kilo-Tier
XI.	75	0,35	1,75
XIV.	66	0,40	1,64
X.	40,7	0,43	1,73
IV.	36,7	0,35	1,34
VIII.	31,4	0,37	1,48

Im Hinblick auf diese Annahme Salkowskis sowie auf die erwähnte Behauptung von Parker und Lusk, daß Stickstoff- und Hippursäureausscheidung (am selben Tiere) gleichsinnig schwanken, ist die von Přibram festgestellte Tatsache von Bedeutung, daß selbst die Hippursäure beim Kaninchen eine energisch steigernde Wirkung auf den Stoffwechsel entfaltet. In einem zu anderen Zwecken unternommenen Versuche, in welchem ein Kaninchen fortlaufend steigende Dosen Hippursäure erhielt, habe ich die Ausscheidung des Stickstoffes im Harne verfolgt, von der nachstehende Tabelle VI ein Bild gibt.

Tabelle VI.

Kaninchen Nr. XV.

Datum	Gewicht	In 24 Stunden: Ges.-Stickstoff nach Abzug d. ger. Hippursäure-N		In 24 Stunden: Harnmenge in cbcm		In 24 Stunden: Kot lufttrocken in g		In 24 Stunden: verzehrter Hafer in g		Subkutan als Na-Salz gereichte Hippursäure
20. III. 04	2150	0,66	Mittel 0,74	32	Mittel 36	12	Mittel 15	82	Mittel 74	
21. III.	2150	0,76		40		16		76		
22. III.	2120	0,81		38		15		65		0,25
23. III.	2080	0,87	Mittel 0,93	50	Mittel 74	34	Mittel 25	35	Mittel 35	0,5018
24. III.	1990	0,83		71		21		21		0,7532
25. III.	1950	1,04		89		48		41		1,0034
26. III.	1930	0,96		78		8		38		1,5019
27. III.	1900	0,93		83		14		39		
28. III.	1950	0,80	Mittel 0,66	40	Mittel 29	15	Mittel 23	72	Mittel 83	
29. III.	1980	0,59		20		20		89		
30. III.	1970	0,60		28		33		89		

Die Stickstoffsteigerung im Harne der Hippursäureperiode ist wie ersichtlich nicht unbeträchtlich, wenn auch nicht so hochgradig wie in den Versuchen von Přibram, wo die Hippursäure die Benzoesäure an Wirkung auf den Stoffumsatz übertroffen hat. Auch in diesem Versuche macht sich ein ähnliches Verhalten geltend, wie es Tabelle IV bei täglicher Benzoesäurezufuhr zeigt. Die steigernde Wirkung auf den Stoffumsatz nimmt bei häufiger Verabreichung von Hippursäure wieder ab. Daß man es aber in

diesen beiden Fällen nicht mit einer Gewöhnung an das Gift zu tun hat, scheint mir die fortdauernde Gewichtsabnahme der Tiere (in Tabelle IV und VI) zu beweisen. — Am Kaninchen wirkt also die Hippursäure sicher in demselben Sinne auf den Stoffumsatz wie die Benzoesäure selbst und der Befund von Kumagawa [bei Salkowski[71]], daß 12 g Hippursäure einem Hunde in 4 Tagen verabreicht keine Wirkung auf den Stoffumsatz hatten, könnte sonach dieselbe Ursache haben, wie die Befunde von Jolin [bei Salkowski[71]] und anderen, welche eine Wirkung der Benzoesäure am Hunde vermißten, welche Ursache dann aber nicht in der von Salkowski angenommenen individuell verschieden mächtigen Entgiftung der Benzoesäure durch Glykokollpaarung gelegen sein kann. Jedenfalls findet beim Kaninchen eine Paralysierung der Stoffwechselwirkung der Benzoesäure durch die Glykokollsynthese nicht statt und auch sonst erweist sich die Hippursäure, wie das stetig abnehmende Körpergewicht und die reduzierte Nahrungsaufnahme beweisen, durchaus nicht ungiftig, namentlich im Hinblick auf die geringen Dosen, die zur Anwendung kamen. Nicht unerwähnt soll es bleiben, daß die Harnuntersuchung keinen Anhaltspunkt für eine Zersetzung der eingeführten Hippursäure gegeben hat, die beobachtete Wirkung also der Hippursäure als solcher zugeschrieben werden muß.

Schließlich ist noch die bedeutende diuretische Wirkung der Benzoesäure sowohl als der Hippursäure zu erwähnen. Dieselbe wurde von Přibram[63]) im Vergleiche mit der anderer aromatischer Säuren studiert. Sie machte sich in jedem meiner Versuche bemerkbar. Als Paradigma können die Tabellen IV und VI dienen.

Alle drei besprochenen Wirkungen der Benzoesäure im Zusammenhange mit der stets zu beobachtenden Verminderung der Nahrungsaufnahme bedingen die in jedem meiner Versuche sich geltend machende bedeutende Gewichtsabnahme der Versuchstiere. Die Wirkungen der Hippursäure auf den Stoffwechsel, die Diurese und die Nahrungsaufnahme sind durchaus denen der Benzoesäure analog; ja selbst eine Wirkung auf die Peristaltik des Darmes scheint, soweit man aus einem Versuche schließen kann, vorhanden zu sein (Tabelle VI). Von einer Entgiftung der Benzoesäure durch die Glykokollpaarung kann somit nur in bezug auf die nervösen (narkotischen) Eigenschaften der Benzoesäure (dem Zentralnervensystem gegenüber) die Rede sein, welche in den durchaus verschiedenen Lösungs- und Verteilungsverhältnissen der beiden Körper begründet sein könnten.

B. Ausscheidung der Benzoesäure.

1. Die physiologische Benzoesäure (Hippursäure)-Ausscheidung.

Von großer Wichtigkeit für die Beurteilung namentlich der quantitativen Geschehnisse bei der Ausscheidung eingeführter Benzoesäure ist das Vorkommen von Benzoesäure und Hippursäure in normalen Harnen, welches von vielen Autoren nicht berücksichtigt wurde, obzwar die normaler Weise zur Ausscheidung gelangenden Mengen gelegentlich so bedeutend sind, daß ihre Vernachlässigung zu falschen Vorstellungen über den Umfang der Benzoesäureausscheidung führen kann, insbesondere dann, wenn die Harne größerer Versuchsperioden [Wiener[104]) 4 Tage, Cohn[21]) einmal 8 Tage] analysiert oder zusammengefaßt werden.

Was nun zunächst das Vorkommen von Benzoesäure im normalen Kaninchenharne anlangt, so berichten, soviel mir bekannt ist, zuerst Weyl und Anrep[102]) hierüber. Sie arbeiteten nach der Methode von Jaarsveld und Stokvis[31]) und betrachten das gewaschene Petrolätherextrakt des angesäuerten alkoholischen Harnauszuges als Benzoesäure, ohne eine Identifizierung der allerdings sehr kleinen Mengen zu versuchen. Nun enthält die nach Jaarsveld und Stokvis aus Harn dargestellte „freie Benzoesäure", wie diese Autoren selbst angeben, Farbstoffe (namentlich Indigo) und ist, wie unten bei Besprechung der Methode ausgeführt wird, noch mit nicht flüchtigen sauren Harnbestandteilen verunreinigt. Es ist zweifelhaft, ob diese Verunreinigungen durch bloßes Waschen mit Wasser entfernt werden können, sodaß die Befunde von Weyl und Anrep das Vorkommen von Benzoesäure im normalen Harne von Kaninchen noch nicht einwandfrei dartun. Dasselbe ist erst von Salkowski[79]) durch die Analyse von 2 Litern durch Kochen konservierten Kaninchenharnes bewiesen worden; er fand im Dampfstromdestillat des Ätherauszuges Benzoesäure und identifizierte sie durch Schmelzpunktbestimmung. Dieser Beweis ist aber nur unter der Voraussetzung als erbracht anzusehen, daß eine Zerlegung der Hippursäure durch sorgfältiges Einsammeln des Harnes vermieden war. Durch van de Velde und Stokvis[99]) ist auf die leichte Zersetzlichkeit der Hippursäure insbesondere in alkalischen Flüssigkeiten hingewiesen, was naturgemäß beim Sammeln größerer Harnquantitäten umsomehr zu befürchten ist. — Ich selbst habe in allen untersuchten Kaninchenharnen nach Aufnahme des Petrolätherauszuges in Barytwasser, Filtration und Dampfstromdestillation (vgl. unten) geringe Mengen einer flüchtigen nach Benzoesäure riechenden Substanz erhalten, deren Menge

zwar nie zur Identifizierung ausreichte, die aber nach dem Verfahren der Isolierung nur als Benzoesäure anzusprechen ist. Umgeht man bei der Darstellung der freien und (als Hippursäure) gebundenen Benzoesäure die Dampfstromdestillation, so erhält man wesentlich höhere Werte für beide. In Tabelle VII sind die betreffenden von Weyl und Anrep und mir erhaltenen Zahlen für die normale Benzoesäure- und Hippursäureausscheidung des Kaninchens zusammengestellt.

Mehr ist in der Literatur über die Mengen der normaler Weise im Harne vorkommenden Hippursäure zu finden. Salkowski[72, 74]) bestimmte an 4 Hunden im Hunger, bei Fleischfütterung und nach Darmunterbindung die Hippursäure zu 0,053 bis 0,204 in 24 Stunden. van de Velde und Stokvis fanden bei ihrem Hunde nach gemischter Kost weder Benzoesäure noch Hippursäure im Harne. Der vielfach zitierte Hammel von Schröder[87]) schied de norma keine Hippursäure aus. Dagegen zeigten die Kaninchen von Parker und Lusk am zweiten bzw. dritten Hungertage eine Ausscheidung von 0,131 bis 0,01 Hippursäure. Die Zahlen von Weyl und Anrep sind in Tabelle VII angeführt. Beim Menschen fand Lewin[46]) bei einer Kost, die reichlich Milch enthielt, eine Tagesmenge von 0,1 bis 0,3 Hippursäure; hier sind auch die älteren Angaben über die Hippursäureausscheidung des Menschen zusammengestellt; darnach schwankt diese zwischen 0,169 und 2,17 im Tagesharne.

Aus dem Angeführten ergibt sich, daß die 24stündige Normalausscheidung von Benzoesäure und Hippursäure bei Kaninchen — namentlich wenn die abgeschiedenen Mengen nicht durch Dampfstromdestillation gereinigt sind — nicht unbeträchtlich sein kann und keinesfalls vernachlässigt werden darf.

Über die Herkunft dieser normalen Benzoesäureausscheidung im Harne sind verschiedene Vermutungen geäußert worden. Salkowski, welcher das Auftreten von Hydrozimmtsäure bei der Pankreasfäulnis von Fleisch entdeckte[81]) und deren Übergang im Organismus in Benzoesäure festgestellt hat[73, 80]), war infolge dieser Befunde zunächst geneigt, die normale Harnhippursäure von der bei der Darmfäulnis auftretenden Phenylpropionsäure abzuleiten[80]) und die selbst im Hunger unverminderte Hippursäureausscheidung[72, 74]) veranlaßte ihn zu der Annahme, daß „auch in den Geweben und Organen fäulnisartige Prozesse verlaufen, welche zur Abspaltung aromatischer Substanzen aus dem Eiweiß führen“[80]). Baumann[8]) konnte bei der Fäulnis des Tyrosins nur aromatische Oxysäuren, nicht aber die Homologen der Benzoesäure, Phenyl-

Tabelle VII.

Versuchstier	Freie Benzoesäure	Mittel in 24 Std.	Hippursäure als Benzoesäure	Mittel in 24 Std.	Bemerkungen	Autor
1800 g schweres Kaninchen	0,009		0,06		Milch-Hafer-Fütterung Mittel aus je 3 Tagen Harn sauer	Weyl und Anrep (102)
dasselbe	0,012		0,05			
1400 g schweres Kaninchen	0,003		0,014		Milch-Hafer-Fütterung 24 stündige Harnmenge Harn sauer	
dasselbe	0,007		0,003			
dasselbe	0,009	0,011	0,018	0,062		
dasselbe	0,003		0,006			
1920 g schweres Kaninchen	0,04		0,23		Milchnahrung 24 stündige Harnmenge, Harn sauer	
dasselbe	0,02		0,10			
1800 g schweres Kaninchen	0,00		0,08		Milch-Hafer-Fütterung Mittel aus 3 Tagen Harn sauer	
Nr. 5	0,008		0,054		24 stündige Harnmenge Reaktion sauer; Dampfstromdestillation Haferfütterung	eigene Versuche
„ „	0,002		0,052			
„ „	0,004		0,056			
„ 6	0,002		0,042			
„ 7	0,002		0,059			
„ „	0,001		0,027		12 stündige Harnmenge Reaktion sauer	
„ 9	0,004	0,003	0,054	0,049	24 stündige Harnmenge Reaktion sauer	
„ „	0,005		0,045			
„ 10	0,002		0,033			
„ „	0,003		0,041			
„ „	0,001		0,044			
„ 11	0,001		0,049			
„ I.	0,006		0,050			
„ X.	0,015		0,111		24 stünd. Harnmenge Reaktion sauer; nicht destilliert Haferfütterung	
„ XI.	0,018		0,089			
„ VIII.	0,014		0,024			
„ XV.	0,013	0,015	0,137	0,090		
„ „	0,002		0,024		nach 4täg. Aufenthalt im Laboratorium	

essigsäure und Phenylpropionsäure nachweisen. Außerdem hatten in seinen Versuchen selbst 25 g Tyrosin keine Steigerung der Hippursäureausscheidung zur Folge. Die Quelle der Phenylpropionsäure und damit der Benzoesäure konnte sonach entgegen Salkowski nicht das Tyrosin sein. Hingegen fand Baumann[9]), daß das durch Schulze und Barbieri aus Eiweiß zum ersten Male dargestellte Phenylalanin bei der Fäulnis extra corpus Phenylessigsäure liefere und hält unter der Annahme, daß die Fäulnis des Phenylalanins im Darme zu Phenylpropionsäure führen könnte, im Darm entstandenes Phenylalanin für die Muttersubstanz der Hippursäure. Man kann nicht behaupten, daß diese Annahme durch die Untersuchungen von Schotten[85]) bewiesen wurde, welcher nach Eingabe von 0,7 g Phenylalanin 0,2 g Hippursäure bei einem Hunde im Harne fand, während die gleiche Menge Phenylpropionsäure eine 18mal größere Hippursäureausscheidung zur Folge hatte, insbesondere wenn man die normale Hippursäureausscheidung von Hunden, die dem Werte 0,2 oft gleich gefunden wurde, in Rechnung zieht und berücksichtigt, daß beim Hunde eine Zersetzung bereits entstandener Hippursäure vorkommt. Später berechnete Salkowski[75]) aus der Summe von Hippursäure und Phenacetursäure des Pferdeharns im Zusammenhange mit dessen Stickstoffgehalt und seinen quantitativen Bestimmungen der Hydrozimmtsäure bei der Eiweißfäulnis, daß mehr als die Hälfte alles zerfallenden Nahrungseiweißes im Darme verfaulen müßte, um die gefundenen Hippursäure-Phenacetursäuremengen zu liefern und lehnt daher für diese wie auch für das Phenol des Herbivorenharnes eine ausschließliche Entstehung aus im Darme faulendem Eiweiß ab. Vielmehr müßten die mit der Nahrung eingeführten aromatischen Substanzen die Grundlage für die normale Hippursäureausscheidung abgeben. Im selben Jahre noch zeigte Baumann[10]), daß die Hippursäure aus dem Harne von Hungerhunden nach Kalomeldarreichung vollständig verschwinde und erwies so die Darmfäulnis als einzige Quelle der Hippursäure beim Fleischfresser. Baas[5]) versuchte die Giltigkeit dieser Anschauung auch für den Pflanzenfresser zu erweisen, wobei er die, wie wir gesehen haben, nicht einwandfrei bewiesene Entstehung von Hippursäure aus im Darme faulendem Phenylalanin als Tatsache annimmt. Er fand nach Tyrosinfütterung per os keine Vermehrung der Hippursäure gegen den Vortag ebenso wie Baumann[8]); da aber hierbei auch keine Änderung des Verhältnisses der Schwefelsäure zur gepaarten Schwefelsäure und keine Vermehrung der Oxysäuren gefunden wurde, lag überhaupt

keine Fäulnis des eingeführten Tyrosins vor. Trotzdem bezieht Baas die hier beobachtete normale Hippursäureausscheidung auf Fäulnis von Phenylalanin im Darme und muß deshalb die Annahme machen, „daß die Fäulnis der Phenylamidopropionsäure unter anderen Bedingungen erfolgen kann als die Fäulnis des Tyrosins“. — Für eine Beziehung zwischen normaler Hippursäurebildung und Darmfäulnis sprechen auch einige Befunde über die noch zu erwähnenden Einflüsse der Ernährung auf die Größe der Hippursäureausscheidung (vgl. unten S. 222).

Hoppe-Seyler äußerte gelegentlich die Vermutung, daß die Hippursäure des normalen Harnes insbesondere von Hungertieren von bei der Gewebsoxydation entstehender Benzoesäure stammen könne. Bei der Oxydation von Eiweiß mit Braunstein und Schwefelsäure [Guckelberg[89]], mit Permanganat und Schwefelsäure [Staedeler*)] wurde vielfach Benzoesäure erhalten. Schulze und Barbieri[88]) zeigten, daß von den hydrolytischen Eiweißspaltungsprodukten der aromatischen Reihe nur das Phenylalanin, nicht aber das Tyrosin bei Chromsäureoxydation Benzoesäure liefert. Da sie gleichzeitig den experimentellen Nachweis erbrachten, daß Tyrosin bei weitgehender Hydrolyse nicht in Phenylaminopropionsäure übergeht, würde als alleinige Quelle der Benzoesäure bei der Eiweißoxydation nur Phenylalanin in Betracht kommen. In der Tat zeigte R. Cohn[24]) (die negativen Befunde von Baumann und Baas bei Fütterung per os sind bereits erwähnt), daß auch subkutan und intravenös verabreichtes Tyrosin zu keiner Hippursäurevermehrung im Harne führt. Doch haben neuere Untersuchungen auch die vollkommene Verbrennlichkeit des Phenylalanins in größeren Dosen als der von Schotten verwendeten erwiesen [Knoop[59])]. Neubauer und Falta[53]) schließen aus dem durch Falta und Langstein**) ermittelten Übergang von Phenylalanin in Homogentisinsäure beim Alkoptonuriker im Zusammenhange mit den Ergebnissen ihrer Versuche über das Verhalten der Phenylpropionsäure bzw. Phenyl-α-Milchsäure bei derselben Erkrankung, daß der Abbau des Phenylalanins auch im normalen Organismus über Phenyl-α-Milchsäure erfolgt. Letztere werde zunächst zu Uroleucin- und Homogentisinsäure oxydiert, welche Säuren im normalen Körper so gut wie vollständig verbrennlich sind [H. Embden***)].

---

*) Journal f. prakt. Medizin **72**, 251; vgl. auch Maly, Sitzungsbericht d. k. Akad. d. Wiss. II. Abt. Febr. 1885 und **97**, sowie Monatshefte f. Chemie **6** (1885) und **9**.

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **37, 513.

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie **18**, 328.

Hiernach würde nächst der Desamidierung die Oxydation nicht wie extra corpus an der Seitenkette, sondern am Benzolring und zwar durch Hydroxylierung der zur Seitenkette in 2 und 5 Stellung befindlichen C-Atome einsetzen und ohne Benzoesäurebildung zur Aufspaltung des aromatischen Ringes führen. Es erscheint aber dieses Problem noch nicht endgiltig erledigt, insbesondere da wie Neubauer (loc. cit.) mitteilt, Phenyl-α-Milchsäure im Kaninchenorganismus nicht vollkommen verbrannt wird. Doch fand Knoop[38]) neuerdings die vollkommene Verbrennlichkeit aller untersuchten, in der α-Stellung der Seitenkette substituierten Propylbenzolderivate (Phenylalanin, Phenyl-α-Milchsäure, Phenylbrenztraubensäure, Phenyl-α-aminozimmtsäure), so daß man wohl bis auf weiteres von einer oxydativen Entstehung von Benzoesäure im intermediären Eiweißstoffwechsel wird absehen können.

Eine Reihe von Autoren [Lücke[47]), Mattschewsky[48]), Lautemann[45])], insbesondere Meißner und Shepard[49]) führten die normale Harnhippursäure der Herbivoren auf mit der Nahrung aufgenommene aromatische Substanzen zurück, insbesondere auf Chinasäure. Sie zeigten, daß die Hippursäureausscheidung beim Pflanzenfresser durchaus von der Art der Ernährung abhänge und daß es insbesondere die Cutikularsubstanz der Pflanzenepidermen sei, welche zu reichlicher Bildung von Hippursäure Veranlassung gebe. Wir haben gesehen, daß auch Salkowski[75]) auf Grund seiner quantitativen Hippursäure- und Phenacetursäure-Bestimmungen im Pferdeharn unter Berücksichtigung des Eiweißstoffwechsels zu derselben Anschauung kommt. Im Zusammenhange damit stehen Mitteilungen, wonach beim Menschen bei vegetabilischer Kost die Hippursäureausscheidung steigen soll (zitiert nach Parker und Lusk loc. cit.).

Von solchen präformierten aromatischen Substanzen, welche im Organismus in Benzoesäure übergehen, sind folgende bekannt: Phenylpropionsäure [Salkowski[79])], Toluol, Äthyl- und Propylbenzol [Nencki-Giacosa[52])], das früher von Schultzen und Graebe [erwähnt bei O. Schotten[85])] für Mandelsäure und von L. v. Nencki[51]) und Salkowski[69]) für Benzamid behauptete analoge Verhalten konnten Schotten[85]) einerseits und Baumann und Herter[11]) andererseits nicht bestätigen, indem sie zeigten, daß Mandelsäure sowie Benzamid den Körper unverändert verlassen. Dagegen geht die Zimmtsäure, und wie jüngst Knoop gezeigt hat, die Phenyl-β-Milchsäure, Benzoylessigsäure und Phenylvaleriansäure im Organismus des Hundes in

Benzoesäure über. Übrigens müssen — die Allgemeingiltigkeit des Knoopschen Schlusses vorausgesetzt, daß die Oxydation der Seitenketten an der β-Stellung erfolgt (wenn die α-Stellung nicht substituiert ist, in welchem Falle scheinbar vollständige Aufspaltung des Ringes erfolgt) — alle aromatischen Säuren mit einfacher Seitenkette zu Benzoesäure oxydiert werden, wenn ihre Seitenkette eine ungerade Anzahl von C-Atomen enthält.

Daß es aber nicht lediglich die in der Nahrung präformierten aromatischen Komplexe sind, welche die Hippursäurebildung beherrschen, geht aus den allerdings spärlich vorliegenden Hungerversuchen hervor, welche übereinstimmend ergeben haben, daß die Hippursäure aus dem Harne hungernder Hunde [Salkowski[72, 74]] und Kaninchen nicht verschwinde (ein Kaninchen von Parker und Lusk zeigte am 6. Hungertage eine Hippursäureausscheidung von 0,04 g). Dagegen hat Baumann[10]) nachgewiesen, daß die Hippursäureausscheidung von Hungerhunden durch Darmdesinfektion unterdrückt werden könne und mehrere Autoren berichten, daß es durch passende Ernährung gelingt, den Harn von Kaninchen hippursäurefrei zu erhalten.

Salkowski[79, 69]) gibt an, daß „der Harn von Kaninchen bei Fütterung mit Kartoffeln so arm an Hippursäure ist, daß sie sich in der Quantität des Tages nicht bestimmt nachweisen lasse". In Übereinstimmung hiermit fand Schröder[87]) bei einem Hammel, der Kartoffel als Futter erhielt, an mehreren Tagen keine Hippursäure im Harne. van de Velde und Stokvis[99]) geben an, daß ihre Kaninchen, welche mit Milch und Gelatine ernährt wurden, keine Benzoesäure und Hippursäure ausschieden. Denselben Befund hat Stadelmann[95]) erhoben. Lewin[46]) bezieht seine niedrigen Hippursäurewerte beim Menschen auf den reichlichen Milchgenuß seiner Patienten. — Es scheint hiernach, daß Kartoffel-, vielleicht auch Milchfütterung der Benzoesäurebildung entgegenwirke, wie dies auch Schröder (loc. cit.) ausspricht; diese Gegenwirkung läßt sich wohl nur als Beschränkung der Darmfäulnis deuten. (Für die Milchdiät gilt eine solche als erwiesen.) Als Gegenstück zu diesen Befunden werden Mitteilungen über eine Vermehrung der Harnhippursäure bei Ernährungsweisen gemacht, bei denen die Konkurrenz vorgebildeter Benzolderivate ausgeschlossen erscheint. Götze und Pfeiffer[27]) und Pfeiffer und Eber[61]) beobachteten eine vermehrte Hippursäureausscheidung bei Pferden nach Pentosenzufuhr und schließen aus ihren Versuchen, daß „landwirtschaftliche Nutztiere dann am meisten

Hippursäure produzieren, wenn ihre Futterrationen relativ reich an stickstofffreien Stoffen sind". Weintraud[103]) fand die Hippursäure nach Thymusgenuß vermehrt, Lewin[46]) desgleichen und ebenso nach Aufnahme von 100 g Rohrzucker und gesteigerter Eiweißzufuhr (Somatose, Plasmon) beim Menschen.

Aus den bisher vorliegenden Angaben über den Einfluß von Krankheiten auf die Menge der normalen Harnhippursäure, insbesondere die Vermehrung derselben bei Fieber [Lewin (loc. cit.)] entgegen Weyl und Anrep (loc. cit.) und Nierenaffektionen (Lewin) läßt sich kein Schluß auf die Quelle der normalen Harnhippursäure ziehen, da die Befunde in der Richtung eventl. vermehrter Darmfäulnis nicht analysiert sind und außerdem eine Ausscheidung von freier Benzoesäure nicht berücksichtigt wurde. Der letztere Einwand trifft aber auch viele andere zur Entdeckung der Quelle der normalen Hippursäureausscheidung angestellten Versuche, zumal die an Hunden ausgeführten, da hier stets mit der Möglichkeit der Wiederzerlegung gebildeter Hippursäure zu rechnen ist.

2. Ausscheidung in den Organismus eingeführter Benzoesäure.

Übergehend zu den Ausscheidungsverhältnissen der Benzoesäure nach Einführung derselben in den Organismus soll zunächst die Dauer der Ausscheidung ohne Rücksicht auf die Form, in der sie erfolgt, besprochen werden.

Offenbar muß die Ausscheidungsdauer eines Körpers, abgesehen von seinen gleichbleibenden physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Tierart (welche Momente für die bloße Nierenarbeit maßgebend sein dürften), von der Applikationsart (per os, subkutan, intravenös), von der Größe der Dosis und im Falle es sich um die Beibringung per os oder in das Unterhautzellgewebe handelt, von der Schnelligkeit der Resorption (bzw. diese wieder von der Menge und Konzentration der Lösung) abhängen. Während nun die Resorptionsgeschwindigkeit aus dem Unterhautzellgewebe unter normalen Verhältnissen bei gleicher Konzentration und Flüssigkeitsmenge als konstant angenommen werden kann, dürfte die Schnelligkeit der Resorption aus dem Magendarmkanal bei gleichen Verhältnissen sicherlich mit dem jeweiligen Füllungsgrade, der Art des Inhaltes, vielleicht auch dem wechselnden Zustande der Tätigkeit desselben Schwankungen unterworfen sein. Es erscheint daher begreiflich, daß die spärlichen Literaturangaben über die Ausscheidungsdauer eingeführter Benzoesäure ausein-

andergehen; insbesondere auch, weil fast ausnahmslos die Benzoesäure per os gereicht wurde und die Angaben sich auf verschiedene Tierarten beziehen. Speziell auf diesen Punkt gerichtete Angaben und Versuche finden sich so viel mir bekannt ist nur bei Wiener und Cohn.

Wiener gibt an, daß die Ausscheidung freier Benzoesäure bei Darreichung per os meist am ersten Tage beendet sei, während die der Hippursäure länger andauere (1,69 und 2,54 g Benzoesäure bei einem 1600 g-Kan.). Cohn glaubt auf einem indirekten Wege den Nachweis geliefert zu haben, daß nach Einführung von Benzoesäure in den Magen die Ausscheidung von ungebundener Benzoesäure nach 24 Stunden noch nicht beendet sei. Er legt seiner Betrachtung das von Wiener aufgestellte Glykokollmaximum von 0,49 pro Kilo Tier nach einmaliger Benzoesäureeinführung zugrunde und kommt zu seinem Schlusse durch den Befund, daß Kaninchen, denen man nach einmaliger Benzoesäurezufuhr per os nach 6, 12 und 24 Stunden subkutan Glykokoll einspritze, im 4tägigen Harne mehr als 0,8 g (als Hippursäure) gebundene Benzoesäure ausscheiden. Gegen diese Berechnung gelten die weiter unten zu erhebenden Bedenken betreffs der Tatsächlichkeit des „Glykokollmaximums", so daß diesem Schluß Cohns die Voraussetzung entzogen erscheint.

Der Hammel Schröders schied 5,56 g Benzoesäure, die ihm im Verlaufe von 12 Stunden per os beigebracht waren, in den dem Beginn der Zufuhr folgenden 24 Stunden derart aus, daß der Harn der zweiten 24 Stunden keine Hippursäure mehr enthielt. Auch in den Versuchen von Parker und Lusk, welche ihren durchschnittlich 2 Kilo schweren Hungerkaninchen tagelang die kleinen Mengen von 0,4 bis 1,0 g Benzoesäure in 2 bis 3 Dosen innerhalb 12 Stunden verabreicht hatten, muß die Ausscheidung meist in 12 Stunden beendet gewesen sein, weil sich sonst die im Harne ausgeschiedenen Hippursäuremengen partiell hätten superponieren, und die Ausscheidung manchmal die Zufuhr hätte übersteigen müssen (wie z. B. in dem Hundeversuch von van de Velde und Stokvis loc. cit. S. 198 vorgekommen ist), was tatsächlich nirgends in ihren Tabellen zu beobachten ist. Desgleichen waren die Ausscheidungen bei den Kaninchen von Katsuyama[34]) in 24 Stunden vollendet, wie auch ein Hund von van de Velde und Stokvis nach Fütterung von 3,41 Benzoesäure als Hippursäure per os die Ausscheidung innerhalb 24 Stunden beendete. Bei dem erwähnten Falle auf S. 198 war dies jedoch nicht der Fall. Die von Jaarsveld und

Stokvis benützten Menschen, selbst die mit gesunden Nieren, brauchten länger als 24 Stunden zur vollständigen Ausscheidung, sowohl bei Eingabe von Benzoesäure als Hippursäure in den Magen (besonders Fall II. Periphere Paralyse bei 3,0 g Benzoesäure und später 1,03 Benzoesäure als Hippursäure). Auch die Hunde von Weyl und Anrep verhalten sich bei 2,12 Benzoesäure scheinbar so, wenigstens im septischen Fieber, und das Kaninchen III von Araki[4]) bei 1,2 Benzoesäure. — Die Ausscheidungsdauer schwankt in diesen Befunden innerhalb der weiten Grenzen von 12 bis über 24 Stunden, was ich auf die angeführten Gründe beziehen möchte.

Die subkutane Applikation ist unter diesen Umständen vorzuziehen. Ich habe in meinen Versuchen ausschließlich nur sie verwendet; auch deswegen um in der weitläufigen Diskussion über manche Einzelheiten des Gegenstandes einen unbefangenen Standpunkt zu gewinnen. — Subkutane Injektionen von Lösungen benzoesaueren Natriums stärkerer Konzentration sind für die Tiere sehr schmerzhaft [wie auch Cohn[21]) mitteilt]; die sonst bei großen Eingriffen ganz stummen Kaninchen schreien nachher oft lange und sind sehr unruhig. Dieser Übelstand läßt sich jedoch durch Verwendung verdünnter Lösungen leicht vermeiden. Die von mir durchgehends verwendete 4 proz. Lösung wird reaktionslos vertragen. Ich habe sie den aufgespannten Tieren stets aus einer Bürette mit Injektionsnadel langsam unter Massage unter die Rückenhaut fließen lassen, wobei die weitaus sicherere Dosierung, welche die Verwendung einer verdünnten Benzoesäurelösung von festgestelltem Titer mittels einer in Zehntel ccm geteilten Bürette ermöglicht, ein erwünschter Vorteil ist. Da ich außerdem, um Diarrhöen zu vermeiden und vergleichbare Werte zu erhalten, stets nur 0,8 Benzoesäure pro Kilo Tier gegeben habe, sind die injizierten Flüssigkeitsquanta im Verhältnis zum Körpergewichte gleichfalls konstant. Wesentliche Differenzen in der Resorptionsgeschwindigkeit dürften also bei meinen Kaninchenversuchen nicht in Frage kommen. Die folgenden Versuche 5, 6, X, XI und XIV in Tabelle VIII zeigen, daß die Ausscheidung von Benzoesäure und Hippursäure im Harne nach subkutaner Verabreichung von 0,8 g Benzoesäure pro Kilo Kaninchen innerhalb 24 Stunden beendet ist; Versuch 7 in Tabelle IX, daß die Ausscheidung beider Formen innerhalb 12 Stunden verläuft und die Versuche 8 und 2 in Tabelle X, daß die Ausscheidung der freien Benzoesäure unter den gegebenen Be-

dingungen nicht länger als 9 Stunden dauert. Versuch 11 (c) der Tabelle XI zeigt die Ausscheidungsdauer der gleichen Dosis nach Einführung per os, auch hier findet man nach 24 Stunden keine freie, dagegen gelegentlich noch geringe Mengen gebundener Benzoesäure im Harne.

Tabelle VIII.

Kaninchen Nr. 5, 2000 g.

Mittlere Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,004
Gebundene Benzoesäure 0,054

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie	gebundene	freie	gebundene	
28. II. 03	0,026*)	0,029*)			
1. III.					1,60 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
2. III.	0,366	1,150	0,362	1,096	
3. III.	0,008	0,054	0,004	0,000	
4. III.	0,002	0,052	0,000	0,000	
5. III.	0,004	0,056	0,000	0,002	

*) In diesem Harne hatte eine leichte Zersetzung stattgefunden, weshalb derselbe von der Berechnung der Normalwerte ausgeschlossen wurde.

Kaninchen Nr. X, 2250 g.

Mittlere Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,015
Gebundene Benzoesäure 0,083

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie**)	gebundene**)	freie	gebundene	
25. I. 04	0,015	0,111	0,000	0,028	1,73 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
26. I.	0,118	1,676	0,103	1,593	
27. I.	0,017	0,082	0,002	0,000	
28. I.	0,015	0,057	0,000	0,000	

**) Nicht durch Dampfstromdestillation gereinigt.

Kaninchen Nr. XI, 2150 g.

Mittlere Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,019
Gebundene Benzoesäure 0,088

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie**)	gebundene **)	freie	gebundene	
3. II. 04	0,018	0,089	0,000	0,001	1,75 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
4. II.	0,337	1,310	0,318	1,222	
5. II.	0,020	0,088	0,001	0,000	

**) Nicht durch Dampfstromdestillation gereinigt.

Kaninchen Nr. XIV, 2090 g.

Als die hier nicht konstante Normalausscheidung ist die des ersten Tages angenommen.

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie*)	gebundene *)	freie	gebundene	
11. III. 04	0,016	0,073			
12. III.	0,231 0,202	1,427	0,217 0,186	1,354	
13. III.	0,005	0,006			

*) Nicht destilliert.

Kaninchen Nr. 6, 1700 g.

Mittlere Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,003
Gebundene Benzoesäure 0,040

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie	gebundene	freie	gebundene	
31. III. 03	0,002	0,042	0,000	0,002	1,360 Benzoesäure als Na-Salz subkut.
1. IV.	0,253	1,072	0,250	1,032	0,506 Glykokoll subkutan
2. IV.	0,006	0,048	0,003	0,008	
3. IV.	0,003	0,039	0,000	0,000	
4. IV.	0,002	0,033	0,000	0,000	

Tabelle IX.

12stündige Ausscheidung. Kaninchen Nr. 7, 1690 g.

Normalausscheidung in 12^h: Freie Benzoesäure 0,001
Gebundene Benzoesäure 0,028

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie	gebundene	freie	gebundene	
28. IV. 03	0,002	0,059	0,000	0,000	
29. IV. 8^h a. m.					1,360 Benzoesäure als Na-Salz subkut.
8^h p. m.	0,194	1,021	0,193	0,993	1,022 Glykokoll subkutan
30. IV. 8^h a. m.	0,001	0,027	0,000	0,000	

Tabelle X.

3stündige Ausscheidung. Kaninchen Nr. 8, 2000 g. 25. VI. 1903.

Zeit	Benzoesäure im ganzen		Zufuhr
	freie	gebundene	
8^h 10' a. m.			1,611 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
11^h 10'	0,092	0,422	
2^h 10' p. m.	0,049	0,449	
5^h 10'	0,013	0,362	
8^h 10'	0,001	0,112	

Kaninchen Nr. 2.), 2500 g. 14. I. bis 16. I. 1905.

Normalausscheidung im Mittel für 3^h: Freie Benzoesäure 0,003
Gebundene Benzoesäure 0,012

Zeit	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie	gebundene	freie	gebundene	
14. I. 7^h p. m.					
15. I. 7^h a. m.	0,008	0,046	0,000	0,000	
1^h p. m.	0,011	0,026	0,005	0,002	1,995 Benzoesäure als Na-Salz
4^h p. m.	0,098	0,505	0,095	0,493	
7^h p. m.	0,138	0,435	0,135	0,423	
10^h p. m.	0,054	0,437	0,051	0,425	
16. I. 10^h a. m.	0,018	0,242	0,006	0,194	

Tabelle XI.

Kaninchen Nr. 11, 1650 g (c).

Mittelwert der Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,001
Gebundene Benzoesäure 0,049

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr
	freie	gebundene	freie	gebundene	
13. VII. 03	0,001	0,049	0,000	0,000	1,312 Benzoesäure als Na-Salz per os
14. VII.	0,032	0,832	0,031	0,783	
15. VII.	0,003	0,081	0,002	0,032	
16. VII.					2,00 Leucin subkut. 1,312 Benzoesäure als Na-Salz per os
17. VII.	0,023	1,137	0,022	1,088	
18. VII.	0,004	0,117	0,003	0,068	1,312 Benzoesäure als Na-Salz per os
19. VII.	0,032	1,210	0,031	1,161	
20. VII.	—	0,041	—	0,000	

Zu den Versuchstabellen ist hier zu bemerken, daß einerseits die nicht absolute Konstanz der Normalausscheidung, die in Abzug gebracht werden muß, andererseits die Methode der Darstellung von Benzoesäure und Hippursäure im Harne selbst es mit sich bringen, daß die Resultate bereits in den Centigrammen unsicher werden. Das Maximum des hierdurch bedingten Fehlers beträgt bei der Berechnung auf die Tagesmenge $\pm$ 0,02 Benzoesäure. Schwankungen bis zu dieser Grenze sind deshalb bei der Beurteilung der Versuchsresultate nicht zu berücksichtigen. Bei der Bewertung der gleich zu besprechenden Benzoesäurebilanz dagegen, die sich als Differenz aus der verabreichten Menge und der Summe der gesondert bestimmten ungepaarten und als Hippursäure ausgeschiedenen Benzoesäure berechnet, ist somit der Fehler im ungünstigsten Falle doppelt so groß $= \pm$ 0,04 Benzoesäure anzusetzen. Wie weiter unten im methodischen Teile ausgeführt werden wird, ist dieser scheinbar nicht unbeträchtliche Fehler jedenfalls nicht größer als der anderer Methoden und beeinträchtigt den Wert der Resultate für den verfolgten physiologischen Zweck nicht in nennenswerter Weise.

Was nun weiter den Umfang der Gesamtbenzoesäureausscheidung (ohne Rücksicht auf die Form derselben) anlangt, so ergibt sich aus den Angaben der Literatur, daß eingeführte Benzoe-

säure durchaus nicht immer quantitativ ausgeschieden wird, wie es die gebräuchlichen Lehrbücher meist angeben. Jaarsveld und Stokvis[31]) fanden bei ihren Versuchen an normalen und nierenkranken Menschen nur durchschnittlich 50 bis 60 Proz. der eingeführten Benzoesäure im Harne wieder. Auch Kronecker[43]) und van de Velde und Stokvis haben bedeutende Verluste zu verzeichnen. Wiener findet bei kleinen Dosen (1,0 pro Kilo) alles wieder, bei größeren Dosen (1,5 pro Kilo) ist jedoch ein mehr oder minder großes Defizit vorhanden. R. Cohn[21]) findet einmal die ganze Menge, ein anderes Mal fehlt ein nicht unbeträchtlicher Anteil. Hierbei handelt es sich immer um per os-Zuführung der Benzoesäure, sodaß die Möglichkeit einer Ausscheidung unresorbierter Benzoesäure mit den Fäces gegeben ist. Die Verluste der genannten Autoren dürften sich in Wirklichkeit noch höher stellen, da keiner von ihnen die Normalausscheidung berücksichtigt hat. Von welcher Bedeutung dieser Umstand sein kann, beweist eine Versuchsreihe von Katsuyama[34]), welcher bei den einzelnen Tieren um 0,1 bis 0,6 Benzoesäure mehr im Harne findet als er zugeführt hatte. Berücksichtigt ist die Normalausscheidung nur in den Versuchen von Schröder und von Weyl und Anrep. Die Verluste in Schröders 2. Versuche und bei Weyl und Anrep sind nicht unbeträchtlich, auch hier wurde die Benzoesäure stomachal zugeführt. Tabelle XII gibt ein Bild der über den Umfang der Benzoesäureausscheidung in der Literatur aufgefundenen verwertbaren Angaben. (Siehe Tab. XII auf S. 231.)

Meine eigenen Erfahrungen über den Umfang der Ausscheidung subkutan zugeführter Benzoesäure sind in Tabelle XIII wiedergegeben, sie beziehen sich durchwegs auf die Zufuhr von 0,8 Benzoesäure pro mille Körpergewicht und haben also zunächst nur für diese Dosis Geltung. (Siehe Tab. XIII auf S. 232.)

Man findet hiernach auch bei subkutaner Einverleibung von benzoesaurem Natrium die eingeführte Benzoesäuremenge in vielen Fällen nicht vollständig als Benzoesäure und Hippursäure im Harne wieder. Die Größe des nicht wieder gefundenen Anteiles ist auch bei gleichmäßiger pro Kilodosierung und Berechnung nicht konstant und mitunter sehr beträchtlich, sie schwankt individuell in weiten Grenzen. Eine gesetzmäßige Abhängigkeit des Umfanges der Ausscheidung von der absoluten Größe der eingeführten Dosis ergibt sich ebensowenig wie eine Beziehung zur Größe des Stickstoffstoffwechsels (bemessen nach der Größe der absoluten oder pro Kilo berechneten

Tabelle XII.*)

Autor	Versuchsobjekt	Gegebene Benzoesäure	Ausgeschied. Benzoesäure	Bilanz absolut	Bilanz in Proz. der Zufuhr
Jaarsveld und Stokvis p. 278	Mensch, Nieren gesund	3,00 per os	2,005	— 0,995	— 33,1
Wiener (I) p. 316	Kaninchen 1500	1,527 „ „	1,507	— 0,020	— 1,3
„	„ 1000	1,018 „ „	0,980	— 0,038	— 3,5
„	„ 1500	2,347 „ „	1,791	— 0,556	— 23,6
„	„ 1540	2,356 „ „	1,868	— 0,488	— 20,6
„	„ 1100	1,683 „ „	1,147	— 0,536	— 31,9
Wiener (I) p. 320	„ 1250	1,913 „ „ + 1,25 Glykokoll sbkt.	2,020	+ 0,107	+ 5,6
„	„ 1890	4,514 per os + 1,5 Glykokoll sbkt.	3,663	— 0,851	— 19,8
„	„ 1000	1,994 per os + 1,0 Glykokoll sbkt.	1,568	— 0,426	— 21,4
Wiener (I) p. 324	„ 1240	2,108 per os + 0,44 Harnsäure sbkt.	1,929	— 0,279	— 13,2
„	„ 1220	2,074 per os + 0,44 Harnsäure sbkt.	1,975	— 0,099	— 4,8
Cohn (I) p. 336	„ 1550 2020	6,2 per os + Leim per os	6,1	— 0,100	— 1,6
„ p. 339	„ 1070	2,1 per os + Leucin subkutan	1,65	— 0,35	— 16,7
Katsuyama**)	„ 2693	0,85	0,97	+ 0,12	+ 14,1
„	„ 2441	0,85	1,19	+ 0,34	+ 40,0
„	„ 2448	0,85	1,05	+ 0,20	+ 23,5
„	„ 1975	0,85	1,44	+ 0,59	+ 69,4
Schröder	Hammel	5,564 per os	5,54	— 0,02	— 0,36
„	„	5,79 „ „	5,46	— 0,33	— 7,7
Weyl und Anrep	Hund	2,12 „ „	1,67	— 0,45	— 21,2

*) In dieser Tabelle sind naturgemäß nur Versuche berücksichtigt, in welchen das Ende der Ausscheidung von Benzoesäure und Hippursäure abgewartet worden ist. Die Versuche von Jaarsveld und Stokvis und Kronecker an nierenkranken Menschen und Kaninchen sind aus begreiflichen Gründen ebenfalls von der Beurteilung des Umfanges der Benzoesäureausscheidung im Harne auszuschließen.

**) Die hier gegebenen Zahlen sind aus den im Originale mitgeteilten Werten von benzoesaurem Natrium und Hippursäure berechnet.

Tabelle XIII.

Tier Nr.	Gewicht	Benzoesäure		Bilanz		
		subkutan gegeben stets = 0,8 p. K.	wieder-gefunden	absolut	in Proz. der Zufuhr	pro Kilo
2.	2500	2,00	1,82	— 0,18	— 9	— 0,07
XI	2150	1,75	1,54	— 0,21	— 12	— 0,09
5.	2000	1,60	1,46	— 0,14	— 8,7	— 0,07
8.	2000	1,61	1,48	— 0,13	— 8,1	— 0,06
XVI.	1970	1,57	1,52	— 0,05	— 3,2	— 0,03
I.	1900	1,53	1,42	— 0,11	— 7,2	— 0,05
VIII.	1850	1,48	1,26	— 0,22	— 14,9	— 0,12
6.	1700	1,36	1,28	— 0,08	— 5,9	— 0,05
7.	1690	1,36	1,19	— 0,17	— 12,5	— 0,10
IV.	1660	1,34	1,06	— 0,28	— 20,9	— 0,17
11a.	1650	1,31	1,20	— 0,11	— 8,4	— 0,07
V.	1370	1,09	0,59	— 0,5	— 45,9	— 0,37
VI.	1320	1,04	0,92	— 0,12	— 11,5	— 0,10
VII.	800	0,65	0,40	— 0,25	— 38,4	— 0,30

normalen Stickstoffausscheidung, Tabelle XIV). Dagegen scheint eine gegenseitige Beziehung zwischen dem Defizit und der ausgeschiedenen Hippursäuremenge in dem Sinne zu bestehen, daß bei gleicher Zufuhr von Benzoesäure pro Kilo das Defizit um so größer wird, je geringer die ausgeschiedene Menge ist (Tabelle XV).

Tabelle XIV.

Tier Nr.	Absolut		Pro Kilo	
	Defizit	Harn-stickstoff	Defizit	Harn-stickstoff
V.	0,5	0,686	0,37	0,500
VII.	0,25	0,713	0,30	0,891
IV.	0,28	0,601	0,17	0,342
VIII.	0,22	0,859	0,12	0,465
XI.	0,21	1,004	0,09	0,467
VI.	0,12	0,988	0,10	0,748

Insbesondere deutlich tritt dieses Verhalten hervor, wenn man diejenigen Versuche zusammenstellt, in welchen auch annähernd die gleichen absoluten Benzoesäuremengen gereicht wurden (Tabelle XVI).

Tabelle XV.

Tier Nr.	In Prozenten der Zufuhr		
	Defizit	gebundene Benzoesäure	freie Benzoesäure
V.	45,9	41,3	12,8
VII.	38,4	36,9	24,7
IV.	20,9	72,0	7,1
VIII.	14,9	75,7	9,4
7.	12,5	72,3	15,2
XI.	12,0	69,7	18,3
VI.	11,5	73,2	15,3
2.)	9,0	77,0	14,0
5.	8,7	68,8	22,5
11a.	8,4	83,2	8,4
8.	8,1	82,0	9,9
I.	7,2	79,1	13,7
6.	5,9	75,7	18,4
XVI.	3,2	93,6	3,2

Bemerkenswerterweise ist die Beziehung des Defizits zu der Menge der gleichzeitig ausgeschiedenen freien Benzoesäure nicht von derselben Gesetzmäßigkeit beherrscht. Das heißt (soweit das vorliegende Versuchsmaterial reicht) der ungebunden ausgeschiedene Teil eingeführter Benzoesäure (Defizit + freie Benzoesäure) verteilt sich in der Weise auf Defizit und freie Säure, daß das Defizit meist mit der Größe der Gesamtheit des ungebundenen Teiles zu- und abnimmt; diese Zu- und Abnahme erfolgt aber nicht proportional, sodaß die gleichzeitig ausgeschiedenen Mengen freier Säure ein einheitliches Verhalten zum Defizit nicht zeigen (vgl. Tabelle XVI). Das Verhalten des Benzoesäuredefizits läßt sich nach Tabelle XV und XVI auch so ausdrücken: bei gleicher pro Kilo-Dosis zugeführter Benzoesäure scheiden Kaninchen um so weniger Gesamtbenzoesäure aus, je weniger Glykokoll

Tabelle XVI.

Tier Nr.		Gegebene Benzoesäure	in Prozenten der Zufuhr		
			Defizit	gebundene Benzoesäure	freie Benzoesäure
I.	5.	1,60	8,7	68,8	22,5
	8.	1,61	8,1	82,0	9,9
	XVI.	1,57	3,2	93,6	3,2
II.	VIII.	1,48	14,9	75,7	9,4
	I.	1,53	7,2	79,1	13,7
III.	IV.	1,34	20,9	72,0	7,1
	7.	1,36	12,5	72,3	15,2
	6.	1,36	5,9	75,7	18,4
	11a.	1,31	8,4	83,2	8,4
IV.	V.	1,09	45,9	41,3	12,8
	VI.	1,04	11,5	73,2	15,3

sie an Benzoesäure zu paaren vermögen, das Defizit ist sonach eine Funktion des Umfanges der Hippursäuresynthese. Damit könnte auch zusammenhängen, daß in den Versuchen von Wiener[104]) kleinere Dosen in größerem Umfange ausgeschieden und vollständiger gepaart wurden. Doch lassen sich diese Versuche, abgesehen von der hierfür unzweckmäßigen per os-Darreichung der Benzoesäure (vgl. oben), deswegen zur Beurteilung des gezogenen Schlusses nicht heranziehen, weil die verschiedene Dosierung an verschiedene Tiere erfolgte, deren Paarungsvermögen, wie sich schon aus Tabelle XIII ergibt, individuell schwankend ist. Ich verfüge aber über einen Versuch, welcher am selben Tiere mit zwei verschieden großen Benzoesäuredosen subkutan ausgeführt worden ist und in der Tat zeigt, daß nach der kleineren Dosis der relative Syntheseumfang größer und das relative Defizit kleiner ist als nach der größeren Dosis (Tabelle XVII).

Für den Verbleib der weder als Benzoesäure noch als Hippursäure im Harne ausgeschiedenen Mengen zugeführter Benzoesäure kommt bei der stomachalen Applikation früherer Autoren zunächst eine mangelhafte Resorption aus dem Darmkanal in Betracht, welche auch Jaarsveld und Stokvis für ihre Verluste verantwortlich machen. Wiener[104]) ist es jedoch nicht gelungen, Benzoesäure im Kot nachzuweisen. Bei meinen Subkutan-

Tabelle XVII.

Kaninchen Nr. 11, 1650 g (a, b).

Mittelwert der Normalausscheidung nach einem späteren Versuche.

Freie Benzoesäure 0,001.

Gebundene Benzoesäure 0,049.

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr	Benzoesäure-Bilanz	Verhältnisse in Prozenten der Zufuhr		
	freie	gebundene	freie	gebundene			gebund. Benzoesäure	freie Benzoesäure	Defizit
8. VII. 03					1,31 Benzoesäure als Na-Salz subkut.				
9. VII. 03	0,111	1,139	0,110	1,090		— 0,11	83,2	8,4	8,4
1. VII. 03					0,656 Benzoesäure als Na-Salz subkut.				
2. VII. 03	0,038	0,645	0,037	0,596		— 0,023	90,9	5,6	3,5

versuchen mußte man an eine eventuelle Ausscheidung in den Darm denken, insbesondere im Hinblicke auf die Darmwirkung größerer Dosen und die Mitteilung von Kobert[40]) über den Übergang von Benzoesäure in den Mundspeichel bei Hunden. In der Tat habe ich in einem Falle, wo 1,0 Benzoesäure pro Kilo subkutan Diarrhoe verursacht hatte, Benzoesäure im Darminhalt nachgewiesen und durch Schmelzpunktbestimmung sichergestellt. Dagegen ergab die analoge Untersuchung des Dünndarminhaltes nach 0,8 Benzoesäure pro Kilo subkutan ein negatives Resultat (vgl. Tab. XVIII).

Tabelle XVIII.

Tier Nr.	Gewicht	Zeit	Zufuhr subkutan	Benzoesäure im Darminhalt		Bemerkungen
				freie	gebundene	
3	1930	28. II. 1903 a. m.	1,929 g Benzoesäure als Na-Salz	0,112 S. P. 122°	nicht bestimmt	Diarrhoe, am Nachmittag getötet, der gesamte Darminhalt untersucht
4	2000	25. VI. 1903 8¹⁰ a.m.	1,611 g Benzoesäure als Na-Salz	0,002	0,003	Keine Diarrhoe, um 8¹⁰ p. m. getötet, der Dickdarminhalt ging verloren

Nach dem Ausfalle dieser Versuche braucht man bei nicht diarrhoisch wirkenden Dosen Benzoesäureverluste mit dem Kote nicht zu befürchten.

Ferner ist zur Aufklärung des Schicksals der fehlenden Benzoesäure die von Salkowski[76]) bei Kaninchen, Menschen und Hunden nach Benzoesäuregenuß im Harne entdeckte reduzierende Substanz heranzuziehen. Dieselbe wurde von Schulten bei Kobert[46]) studiert und auch von Kumagawa[41]) bei Hunden gefunden. Kobert (loc. cit.) spricht sie als gepaarte Glykuronsäure an. Siebert[91]) hat in der Tat bei Jaffé den Nachweis geliefert, daß nach Benzoesäuregenuß eine gepaarte Glykuronsäure im Harne ausgeschieden wird, welche möglicherweise Benzoesäure-Glykuronsäure ist, analog der von Jaffé[32]) entdeckten, nach Dimethylaminobenzaldehydfütterung auftretenden Dimethylamino - Benzoesäure - Glykuronsäure. Ob diese Feststellung insbesondere auch für Kaninchen Geltung hat und in welchem Umfange diese Paarung vor sich geht, ließ sich aus dem allein mir vorliegenden Referate der Arbeit von Siebert nicht entnehmen. Ich selbst habe über diesen Gegenstand keine Erfahrungen gesammelt und kann nur über je einen einschlägigen Fall berichten. Einerseits fand ich einmal nach Benzoesäurezufuhr den Harn des betr. Kaninchens optisch inaktiv, andererseits ergab sich einmal, als neben der gesonderten Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure auch eine Bestimmung der Gesamtbenzoesäure vorgenommen wurde (vgl. Methodik), daß während die erste Bestimmung ein bedeutendes Benzoesäuredefizit auswies, dasselbe nach der direkten Bestimmung der gesamten Benzoesäure verschwindend klein war; in diesem Falle war also sicher Benzoesäure noch in einer dritten Form im Harne vorhanden.*) Es ist übrigens nicht ausgeschlossen, daß die supponierte gepaarte Glykuronsäure wenigstens partiell in das Essigätherextrakt des Harnes übergeht (Salkowski gibt an, daß sie zwar leicht in Wasser, aber auch in Essigäther löslich sei) und als Hippursäure mit bestimmt wird, doch können sich hieraus kaum ernstliche Fehler für die Hippursäurebestimmung ergeben.

Von größter Wichtigkeit für alle Schlüsse, die man aus der Menge der ausgeschiedenen Hippursäure ziehen will, ist der Nachweis, daß das Defizit nicht etwa auf Kosten der Hippursäure zustande kommt. Dieser Nachweis mußte erbracht werden, denn, wenn wir auch heute sicher wissen, daß

*) Leider sind die Bestimmungen der Gesamtbenzoesäure erst in den letzten Versuchen vorgenommen worden, sodaß ich über den größten Teil der gefundenen Defizite in der angedeuteten Richtung nichts aussagen kann.

Tabelle XIX.*)

Autor	Versuchsobjekt	gereichte Hippursäure als Benzoesäure berechnet	ausgeschiedene Hippursäure als Benzoesäure	Bilanz
Jaarsveld und Stokvis	Normaler Mensch	2,06 per os	2,12	+ 0,06
van de Velde und Stokvis p. 194	Hund	3,41 per os	3,29	— 0,12
van de Velde und Stokvis p. 196	Kaninchen B	1,02 per os	1,23	+ 0,21
	dasselbe	1,02 per os	0,96	— 0,06
	Kaninchen C	1,02 subkut.	0,63	— 0,39
	dasselbe	1,02 subkut.	1,10	+ 0,08

Tabelle XX.

Versuch Nr. XV. Kaninchen 2120 g.

Normalausscheidung: Freie Benzoesäure 0,009
Gebundene Benzoesäure 0,089

Datum	Benzoesäure im ganzen		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr subk. Hippursäure als Benzoesäure berechnet	Hippursäure Bilanz in Benzoesäureäquivalenten
	freie**)	gebundene **)	freie	gebundene		
22. III. 04	0,009	0,089	0,000	0,000	0,17	
23. III.	0,008	0,227	0,000	0,138	0,34	— 0,032
24. III.	0,023	0,361	0,014	0,272	0,5136	— 0,068
25. III.	0,014	0,552	0,005	0,463	0,68	— 0,050
26. III.	0,014	0,715	0,005	0,626	1,024	— 0,054
27. III.	0,012	1,047	0,004	0,958		— 0,066

*) Hier sind nur Versuche berücksichtigt, in denen einerseits die Ausscheidung vollendet, andererseits keine Zerlegung der Hippursäure eingetreten war und die Nieren unbeschädigt waren.

**) Nicht destilliert.

Hippursäure im Kaninchenorganismus unter normalen Verhältnissen nicht zersetzt wird, so haben doch die spärlich darüber mitgeteilten Versuche, ob eingeführte Hippursäure quantitativ mit dem Harne ausgeschieden wird, kein eindeutiges Resultat ergeben (Tab. XIX). Der Versuch in Tabelle XX führt diesen Beweis.

C. Die Hippursäuresynthese.

Die Hippursäuresynthese wurde, nachdem Liebig die Hippursäure als erster im Pferdeharn gefunden hatte, von Keller und Wöhler[35]) bzw. von Kühne und Hallwachs[42]) entdeckt.

In der Folge interessierte namentlich der Ort der Synthese im Organismus und die Reversion dieses Vorganges, die Zerlegung von Hippursäure im Tierkörper, bei verschiedenen Tierarten, unter pathologischen Verhältnissen, wie denn auch Störungen der normalen Synthese durch krankhafte Zustände Gegenstand vieler Versuche wurden. Bunge und Schmiedeberg[20]) wiesen beim Hunde als alleinigen Ort der Synthese die Niere nach und zeigten, daß der Vorgang der Synthese auch in ausgeschnittenen und durchbluteten Nieren (insbesondere vom Schwein) stattfindet. Kochs[39]) gelang zuerst auch in zerhackten, mit Blut gemischten Nieren die Synthese nachzuweisen, später erbrachten diesen Beweis noch Berninzone[15]) unter Verwendung von Benzylalkohol und Benzaldehyd, dann Bashford und Kramer[6]) und schließlich Abelous et Ribaut[3]), so daß es sicher zu sein scheint, daß die Synthese durch ein Ferment besorgt wird. Durch die Arbeit von Salomon[82]) bei Salkowski, welcher zeigte, daß auch nephrektomierte Kaninchen Hippursäure bilden, wurde sichergestellt, daß diese Tiere auch an anderen Orten als der Niere zur Synthese befähigt sind. Schmiedeberg[84]) und Minkowski[50]) stellten sicher, daß der Hund Hippursäure durch ein Ferment (Histozym) zerlege, das Kaninchen jedoch vermag Hippursäure nicht zu spalten [van de Velde und Stokvis (loc. cit.), Minkowski (loc. cit.)]. Für diese Versuche von aufklärender Bedeutung und für alle Hippursäurebestimmungen im Harne fortan ausschlaggebend war die Feststellung von van de Velde und Stokvis (loc. cit.), daß Hippursäure in alkalischen, insbesondere eiweißhaltigen Harnen, ja in diesen selbst bei sauerer Reaktion zum Teile schon in der Blase eine passive Zersetzung (Verseifung) erleidet. Diese Spaltung spielt sich auch in reinen alkalischen Hippursäurelösungen, namentlich rasch bei Körpertemperatur, ab. Durch Aufkochen der Lösungen wird sie verhindert; sie scheint daher fermentativer Natur zu sein, in einigen Fällen wird der

Micrococcus ureae als Ursache beschuldigt. Die Tatsache, daß auch in normalen Harnen, wenn sie alkalisch reagieren, Zersetzung von Hippursäure leicht eintritt, macht es notwendig, bei Hippursäurebestimmungen im Harne dessen Reaktion mit peinlicher Sorgfalt zu verfolgen und alle Versuche von der Beurteilung auszuschließen, in denen der Harn nicht sauer reagiert. van de Velde und Stokvis fanden bei „Pflanzennahrung“ alkalischen Harn der Kaninchen und Hippursäurezerlegung. Es dürfte da Grünfütterung gemeint sein, denn bekanntlich reagiert der Kaninchenharn bei Haferfutter sauer, wie es bei meinen Versuchen auch immer der Fall war. Es ist also nicht notwendig an Hungertieren zu arbeiten oder die Kaninchen, wie es van de Velde und Stokvis und andere getan haben, mit Milch und Gelatine zu ernähren. Abgesehen davon, daß viele Tiere das veränderte Regime nicht vertragen und herunter kommen, lag ja die Notwendigkeit vor, gerade bei normaler Ernährungsweise die Gesetzmäßigkeiten der Hippursäuresynthese festzustellen, weil (vgl. oben S. 222) ein Einfluß der Ernährungsweise nicht ausgeschlossen ist.

Über den Umfang der Hippursäuresynthese, der sich trotz der Feststellungen über die Beziehungen des Defizits nur aus der ausgeschiedenen Hippursäuremenge einwandfrei ergibt und niemals bloß aus der Beurteilung der Ausscheidungsgröße freier Benzoesäure erschlossen werden sollte, unter normalen Verhältnissen finden sich bis Wiener nur wenige brauchbare Angaben in der Literatur vor. Man schien anzunehmen, daß normaler Weise insbesondere beim Menschen alle eingeführte Benzoesäure als Hippursäure ausgeschieden werde. Gleichwohl ist dieser Fall nur einmal bei einem Selbstversuche von Schröder [loc. cit.]*) und einmal von van de Velde und Stokvis (loc. cit.) bei einem Kaninchen beobachtet worden, abgesehen von einem Selbstversuche von Hoffmann[28]) und je einem Hundeversuche von Sprengel[94]) und Schmiedeberg (loc. cit.), wo gleichzeitig Glykokoll eingeführt wurde; in allen anderen Versuchen wurde stets auch freie Benzoesäure im Harne gefunden. Die Regel ist sonach das Vorkommen freier Benzoesäure neben Hippursäure im Harne nach Fütterung von Benzoesäure, auch wenn man nur jene Versuche berücksichtigt, welche nach der Feststellung von van de Velde

*) Hippursäurewerte nach Benzoesäuregenuß beim Menschen publiziert jüngst J. Schmid[83]), gibt jedoch über fällige Ausscheidung freier Benzoesäure nichts an; es hat den Anschein, als ob bei seinen Versuchen überhaupt keine Trennung von freier und gebundener Benzoesäure im Harne gemacht wäre.

und Stokvis (loc. cit.) über die passive Zersetzung von Hippursäure ausgeführt worden sind. Selbst wenn kleine Dosen gereicht werden, wird immer ein gewisser Bruchteil von Benzoesäure ungepaart im Harne ausgeschieden, wie wohl die Tiere viel größere Mengen zu paaren vermögen. Cohn[21]) fand nach der geringen Dosis von 1,0 g Benzoesäure bei einem 2010 g-Kaninchen noch 0,04 freie Benzoesäure im Harne. Mein Versuch Nr. 11, Tabelle XVII, illustriert dieses Verhältnis besonders deutlich, obwohl das Kaninchen von 1,31 Benzoesäure 1,09 an Glykokoll gepaart hatte, hat es 3 Tage später von 0,66 Benzoesäure noch 0,04 ungebunden ausgeschieden. Hiermit steht in guter Übereinstimmung, daß Kaninchen auch normaler Weise freie Benzoesäure ausscheiden (vgl. oben S. 216f.). Ja selbst wenn gleichzeitig Glykokoll eingeführt wird in einer Menge, welche unabhängig von dem Glykokoll des Versuchstieres mehr als ausreicht, um die gegebene Benzoesäure zu paaren, werden noch beträchtliche Mengen freier Benzoesäure ausgeschieden. Dies geht aus den Versuchen von Wiener[104]) S. 320 hervor und spricht sich auch in meinem Versuche Nr. III, Tabelle XXI, aus, in welchem die Zufuhr einer der im Vorversuche ausgeschiedenen Menge freier Benzoesäure äquivalenten Glykokollmenge im Hauptversuche ein Plus von gebundener Benzoesäure ergab, welches mit nur 0,04 an der Grenze der Nachweisbarkeit liegt. Alle diese Momente

Tabelle XXI.

Kaninchen Nr. III. 2360.

	Datum	Benzoesäure *) im ganzen		Summe	Zufuhr
		freie	gebundene		
Vorversuch	28. XI. 03				1,78 Benzoesäure als Na-Salz subkutan
	29. XI. 03	0,30 0,30	0,85 0,84	1,145	
Hauptversuch	30. XI. 03				1,78 Benzoesäure als Na-Salz + 0,21 Glykokoll in derselben Lösung subkutan
	1. XII. 03	0,27 0,28	0,89 0,89	1,165	

liefern den Beweis, daß die Synthese zwischen Benzoesäure und Glykokoll im Organismus nicht quantitativ verläuft, worauf auch Cohn[22]) hingewiesen hat,

*) In diesem Falle wurde die Normalausscheidung nicht bestimmt.

indem er bezweifelt, daß selbst im Überschuß eingeführte Benzoesäure alles vorhandene Glykokoll zu paaren vermöchte. Hierin stimmt die Hippursäuresynthese mit anderen vitalen Synthesen wie der Glykuronsäuresynthese [C. Neuberg[54])] überein. Schon der weitaus geringere Umfang der Glykokollsynthese mit anderen paarungsfähigen Substanzen [Phenylessigsäure, Salicylsäure*)] muß den Zweifel erwecken, ob die Benzoesäure in quantitativer Hinsicht nicht auch nur Unvollkommenes leiste. Für dieses Verhalten können mehrere Gründe maßgebend sein, 1. ist es möglich, daß die Synthese langsamer vor sich geht als die Ausscheidung der freien Benzoesäure, welche bei subkutaner Applikation der

*) Salicylsäure geht nach Kunkel (Toxikologie) nur etwa zu 20 bis 30 Proz. mit Glykokoll eine Paarung ein; die anderen Oxybenzoesäuren in noch geringerem Ausmaße (Schotten, Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, 29), hierbei konkurriert die Synthese mit Schwefelsäure, was bei der Benzoesäure vermißt wird (Baumann und Herter, loc. cit.). Über die Quantitäten der nach α-Toluylsäure ausgeschiedenen Phenacetursäure im Vergleiche mit der Hippursäurebildung aus äquivalenten Benzoesäuremengen am selben Tiere geben die folgenden Versuche (Kaninchen X u. XI) Aufschluß, bei welchen insbesondere auch auf die Dauer der Ausscheidung und die Größe des „Defizits" hingewiesen sei. Die Bestimmung von Toluylsäure und Phenacetursäure geschah (mit Umgehung der Dampfstromdestillation) nach derselben Methode wie die von Benzoesäure und Hippursäure, nachdem ein Vorversuch die Zulässigkeit des Verfahrens erwiesen hatte.

Kaninchen Nr. X.

Datum	Gewicht g	Ges.-Stickstoff in 24h.	Ausgeschied. Benzoesäure freie	Ausgeschied. Benzoesäure gebundene	nach Abzug der Normalwerte freie	nach Abzug der Normalwerte geb.	Zufuhr	
25. I. 04.	2250	0,855	0,015	0,111	0,00	0,00	1,73 Benzoesäure als Na-Salz subkut.	Vorversuch
26. I.	2100	0,828	0,118	1,676	0,10	1,56		
27. I.	2120	1,199	0,017	0,082	0,00	0,00		
28. I.	2050	0,921	0,015	0,057	0,00	0,00		
			Ausgeschied. Toluylsäure freie	Ausgeschied. Toluylsäure gebundene	nach Abzug d. Normalwerte freie	nach Abzug d. Normalwerte geb.		
31. I.	1920						1,93 α-Toluylsäure als Na-Salz subkut.	Hauptversuch
1. II.	1780	1,257	0,073	0,348	0,06	0,24		
2. II.	1670	0,986	0,057	0,168	0,04	0,07		
3. II.	†							

Benzoesäure, wie aus den angeführten Versuchen (Tabelle X) hervorgeht, der Hauptmasse nach sehr rasch verläuft. 2. ist es möglich, 'daß die Synthese auch beim Kaninchen nicht an allen Stätten des Stoffwechsels vor sich geht, und daß daher das überall entstehende oder nach der Einführung in die Blutbahn überall kreisende Glykokoll durch Oxydation an allen den Orten der Paarung entzogen wird, die zur Synthese nicht befähigt sind. 3. ist daran zu erinnern, daß Synthesen auch im Reagenzglase sehr häufig nicht quantitativ verlaufen, die von der Theorie geforderte Menge des synthetischen Produktes liefern. Insbesondere scheint das auch nicht stets bei der Benzoylierung des Glykokolls nach Baum[7]) der Fall zu sein, wiewohl man dies anfangs angenommen hatte; wenigstens konnte Spiro[93]) mit dieser Methode „nicht immer die gleiche maximale Ausbeute an benzoyliertem Produkt" erhalten, die Glykokollbestimmung von Charles Fischer[25]) in der Gelatine nach dieser Methode hat zwar übereinstimmende Parallelwerte ergeben; E. Fischer[26]) fand aber weit mehr Glykokoll (16 Proz.) nach seiner Methode, und selbst

Kaninchen Nr. XI.

Datum	Gewicht g	Ges.-Stickstoff in 24h.	Ausgeschied. Benzoesäure freie	gebundene	nach Abzug der Normalwerte freie	nach Abzug der Normalwerte geb.	Zufuhr	
2.II.04.	2240							Vorversuch
3. II.	2150	1,004	0,018	0,089	0,00	0,00	1,75 Benzoesäure als Na-Salz subkut.	Vorversuch
4. II.	2030	1,630	0,337	1,310	0,32	1,22		Vorversuch
5. II.	2030	1,116	0,019	0,088	0,00	0,00		Vorversuch
			Ausgeschied. α-Toluylsäure freie	gebundene	nach Abzug der Normalwerte freie	nach Abzug der Normalwerte geb.		
6. II.	2000	0,916					1,96 α-Toluylsäure als Na-Salz subkut.	Hauptversuch
7. II.	1966	1,325	0,087	0,474	0,07	0,38		Hauptversuch
8. II.	1918	2,067	0,091	0,446	0,07	0,36		Hauptversuch
9. II.	1870	1,436	0,064		0,05			Hauptversuch
10. II.	1790	0,818						Hauptversuch
15. II.	1630	†						Hauptversuch

Baum erwähnt, daß die Entstehung von Nebenprodukten, die die Benzoylierung anderer Aminosäuren beeinträchtigen, zwar in geringem Umfange, aber doch auch bei der Hippursäuresynthese in vitro sich geltend macht. — Danach ist es möglich, daß auch der Akt der Synthese an sich im Organismus nicht quantitativ verläuft.

Eine zahlenmäßige Bestimmung des Umfanges der Hippursäuresynthese beim Kaninchen hat zuerst Wiener[104]) vorgenommen. Er hat in 5 Versuchen, in denen zwischen 1,0 bis 1,56 g Benzoesäure pro Kilo Kaninchen per os gereicht wurde, in den 4tägigen Harnen nie mehr als 0,8 g als Hippursäure gebundene Benzoesäure pro Kilo gefunden. Bei den höheren Dosen war nur der ungebundene Anteil der Benzoesäure im Harne vermehrt. Wiener schließt aus diesem Verhalten, daß Kaninchen nach einmaliger Benzoesäurezufuhr nicht mehr als im Maximum 0,8 gebundene Benzoesäure pro Kilo auszuscheiden vermögen. Aus diesem Maximum gebundener Benzoesäure berechnet sich ein Glykokollmaximum von rund 0,49 g*) Glykokoll pro Kilo Kaninchen, welches von Wiener als „Glykokollvorrat" bezeichnet worden ist. Diese maximale Hippursäureausscheidung tritt nach Wiener bereits bei der Dosis von 1,0 g Benzoesäure pro Kilo Kaninchen ein. R. Cohn[21]) einerseits und Parker und Lusk[59]) andererseits zeigten, daß Kaninchen weit mehr als 0,8 gebundene Benzoesäure pro Kilo ausscheiden, wenn man ihnen Benzoesäure in mehreren Dosen im Verlaufe von einem oder mehreren Tagen beibringt.

Meine eigenen Versuche über den Umfang der normalen Hippursäuresynthese des Kaninchens sind durchweg mit der Dosis von 0,8 g Benzoesäure pro Kilo Tier ausgeführt worden. Die Konzentration war stets annähernd 4 Proz. Die Applikation geschah subkutan. Die unter diesen Bedingungen von den einzelnen Tieren pro Kilo ausgeschiedenen Mengen gebundener Benzoesäure sind in Tabelle XXII zusammengestellt.

Man sieht, daß die auf das Körpergewicht bezogene Ausscheidungsgröße der gebundenen Benzoesäure trotz dieser konstanten Verhältnisse sehr schwankend ist. Die einzelnen Werte differieren um weit mehr als den als Fehlergrenze festgestellten Betrag, der zwar bei der Berechnung pro Kilo nicht ein für allemal mit $\pm$ 0,02 sondern nur mit dem entsprechenden Bruchteil dieses Wertes in Rechnung gesetzt werden darf, aber doch als gleichsam

*) Die bei Wiener angegebene und in die Literatur dieses Gegenstandes (Parker und Lusk; Cohn) übergegangene Zahl 0,34 beruht auf einer irrtümlichen Berechnung.

Tabelle XXII.

Versuch Nr.		Gewicht des Tieres	0,8 Benzoesäure als Na-Salz pro Kilo Tier subkutan =	Ausgeschiedene Hippursäure als Benzoesäure pro Kilo Tier	Bemerkungen
	2.)	2500	1,995	0,61	
I.	III.	2360	1,78	0,36	Normalwert nicht bestimmt
	X.	2250	1,73	0,69	0,77 Benzoesäure pro Kilo gegeben
	XI.	2150	1,75	0,57	0,81 Benzoesäure pro Kilo gegeben
II.	XIV.	2030	1,64	0,65	0,78 Benzoesäure pro Kilo gegeben
	8.	2000	1,61	0,66	
	5.	2000	1,60	0,55	
III.	XVI.	1970	1,57	0,75	
	I.	1900	1,53	0,64	
	VIII.	1850	1,48	0,60	
	II.	1770	1,42	0,47	Normalwert nicht bestimmt
IV.	6.	1700	1,36	0,61	
	7.	1690	1,36	0,59	
	IV.	1660	1,34	0,58	
	11a	1650	1,31	0,66	
V.	V.	1370	1,09	0,33	
	VI.	1320	1,04	0,58	
	VII.	800	0,65	0,30	

Versuch Nr.		Gewicht des Tieres	Ausgeschiedene Gesamtbenzoesäure pro Kilo Tier nach subkutaner Injektion von 0,8 pro Kilo Tier	Ausgeschiedene Hippursäure als Benzoesäure pro Kilo Tier	Bemerkungen
	XVI.	1970	0,77	0,75	
I.	6.	1700	0,75	0,61	
	I.	1900	0,75	0,64	
II.	8.	2000	0,74	0,66	0,78 Benzoesäure pro Kilo gegeben
	XIV.	2090	0,74	0,65	0,77 Benzoesäure pro Kilo gegeben
	X.	2250	0,74	0,69	
III.	5.	2000	0,73	0,55	
	11a	1650	0,73	0,66	
	2.)	2500	0,73	0,61	
IV.	XI.	2150	0,71	0,57	0,81 Benzoesäure pro Kilo gegeben
	7.	1690	0,70	0,59	
	VI.	1320	0,70	0,58	
	VIII.	1850	0,68	0,60	
V.	IV.	1660	0,63	0,58	
	II.	1770	0,60	0,47	Normalwert nicht bestimmt
VI.	III.	2360	0,49	0,36	Normalwert nicht bestimmt
	VII.	800	0,50	0,30	
	V.	1370	0,43	0,33	

physiologische Schwankung der Beurteilung zu Grunde gelegt sein mag. Auch wenn man nur die Tiere vergleicht, welche ungefähr gleiche absolute Benzoesäuremengen erhalten haben (d. h. Tiere von annähernd gleichem Körpergewicht), erhält man durchaus nicht konstante Werte für die Ausscheidungsgröße der gebundenen Benzoesäure pro Kilo Tier. Vergleicht man andererseits nur diejenigen Versuche, in denen die Summen der ausgeschiedenen freien und gebundenen Benzoesäure pro Kilo Tier gleich sind (gleiches Defizit pro Kilo), so findet man die Werte für die gebundene Benzoesäure zwar nicht so schwankend (die Einzelwerte in Reihe I, II, IV zeigen gute Übereinstimmung), doch sind immerhin noch deutliche Differenzen vorhanden (Reihe III, V, VI).

Für die Beurteilung des Synthesenumfanges ist die Anschauung, die man über die Bedeutung des Defizits hat, von Wichtigkeit. Es sind da zwei Möglichkeiten gegeben. Entweder das Defizit steht in keinem Zusammenhange mit der Hippursäuresynthese, d. h. unabhängig von der Glykokollpaarung schlägt ein Teil der zugeführten Benzoesäure einen anderen Weg ein; oder die Größe des Defizits ist von dem Umfange der Hippursäuresynthese abhängig, ist der Ausdruck für eine vikariierende Funktion des Organismus in seinem Bestreben, die schädliche Benzoesäure vom Nervensystem fernzuhalten, sie schnell auszuscheiden oder in eine Verbindung von ähnlich unschädlichen Löslichkeitsverhältnissen überzuführen wie die Hippursäure. Im ersten Falle käme das Defizit für die Synthese von vorneherein garnicht in Betracht, die Tiere würden sich in bezug auf Synthese so verhalten, als ob sie nur die tatsächlich im Harne wiedergefundene Benzoesäuremenge (freie + gebundene) erhalten hätten, und die Dosierung der (in Betracht zu ziehenden) Benzoesäure würde von der Individualität des Tieres abhängen. Da aber der Synthesenumfang seinerseits, wie noch gezeigt werden wird, von der Dosierung abhängt, würde der so beschaffene Zusammenhang von Synthesenumfang und Defizit nur diejenigen Versuche vergleichen lassen, welche pro Kilo Tier das gleiche Defizit aufweisen. Im zweiten Falle brauchte man dagegen dem Defizit keine weitere Bedeutung zur Beurteilung des Synthesenumfanges einzuräumen, da sein Wert nichts mehr aussagen würde als der der gebundenen Benzoesäure schon aussagt, und könnte alle Versuche ohne Rücksicht auf den Umfang der Gesamtausscheidung miteinander vergleichen. Mit beiden Anschauungen ist der annäherungsweise Antiparallelismus zwischen Defizit und gebundener Benzoesäure zu vereinbaren. Daß das Defizit mit der Größe der verabreichten Dosis zunimmt (vgl. Wiener

S. 317 und Vers. No. 11 Tab. XVII), spricht mehr zugunsten der zweiten Möglichkeit. Ob man aber nun die Versuchsresultate unter dem einen oder anderen Gesichtspunkte betrachtet, eine Konstanz des Synthesenumfanges ist nirgend zu finden.

Der Umfang der Hippursäuresynthese verschiedener Tiere steht also in keinem erkennbaren Verhältnis zu deren Gewicht. Auch wenn man die Unsicherheit bedenkt, welche der Bestimmung der reagierenden Masse des Versuchstieres („Reingewicht" E. Voits) durch die Wägung des lebenden Tieres anhaftet, wird man sagen müssen, daß der Umfang der Hippursäuresynthese individuellen Schwankungen unterworfen ist. Auf anderem Wege gelangt man so zu demselben Schlusse, den Salkowski[71]) aus dem Studium der Stoffwechselwirkung der Benzoesäure bei Hunden gefolgert hat (vgl. hierzu auch S. 211). Diese sich aus meinen Versuchen ergebende Unabhängigkeit des Umfanges der Hippursäuresynthese vom Körpergewicht steht im Widerspruch mit den Angaben Wieners, der ihn pro Kilo Tier konstant fand. Es bleibt nun allerdings der Einwand bestehen, daß diese Konstanz eben nur für den maximalen Umfang Geltung habe. Versuche, wie sich die Hippursäuresynthese nach so großen Benzoesäuregaben gestaltet, wie sie Wiener angewendet hat, habe ich wegen der Möglichkeit eines Verlustes an Benzoesäure durch Diarrhöen bei Dosen über 0,8 pro Kilo Kaninchen nicht angestellt — wäre es doch in solchen Fällen nicht zu entscheiden, ob die im Darme eventuell ausgeschiedene Benzoesäure überhaupt der Paarung mit Glykokoll entzogen worden ist (sich das Tier in bezug auf Synthese also so verhält, als ob es um diesen Teil weniger Benzoesäure erhalten hätte) oder der im Harne als ungebunden ausgeschiedenen Benzoesäure zuzuzählen ist. Es ist eben in solchen Versuchen neben den schon besprochenen drei Schicksalswegen der Benzoesäure (freie, gebundene und Defizit) noch mit der Möglichkeit eines vierten (Ausscheidung in den Darm) zu rechnen, dessen Bewertung sich im Einzelfalle aber aller Beurteilung entzieht, da sich eine eventuelle Ausscheidung in den Darm unter dem Defizit verbergen muß und am lebenden Tiere wohl kaum einwandfrei von jenem getrennt werden könnte. Es scheint aber auch bei der Versuchsanordnung von Wiener (einmalige Darreichung von mindestens 1,0 g Benzoesäure pro Kilo per os) gelegentlich mehr als 0,8 gebundene Benzoesäure pro Kilo ausgeschieden zu werden. Auf S. 324 berichtet Wiener[104]) über Versuche mit Benzoesäure unter gleichzeitiger Einfuhr von 0,44 Harnsäure, in welchen die Tiere mehr

als 0,8 gebundene Benzoesäure pro Kilo ausgeschieden haben. Unter der von Wiener selbst als unwahrscheinlich angesehenen Voraussetzung, daß hierbei in kurzer Zeit die gesamte Harnsäuremenge vollständig äquimolekular Glykokoll geliefert hätte, sind diese Versuche im günstigsten Falle so ausgefallen, als ob man den Tieren die entsprechende Glykokolldosis gleichzeitig mit der Benzoesäure eingeführt hätte. In meinem Versuch III, Tab. XXI, habe ich fast das Doppelte der sich aus 0,44 $\bar{\mu}$ äquimolekular berechnenden Glykokollmenge gleichzeitig mit Benzoesäure subkutan injiziert, wobei der dem Vorversuch mit der gleichen Benzoesäuremenge am selben Tier gegenüber beobachtete Ausschlag von + 0,04 gebundener Benzoesäure dicht an der Fehlergrenze liegt, jedenfalls tief unter jenem Ausschlage, den Wiener in seinen Versuchen unter Zugrundelegung des konstanten Maximums berechnet hat. Ferner teilt Cohn[23]) S. 183 unter anderen Versuchen zur Ermittlung der Ausscheidungsdauer der ungebundenen Benzoesäure nach Darreichung per os einen mit, in welchem 24 Stunden nach der Benzoesäuregabe Glykokoll gereicht wurde; die Ausscheidung der gebundenen Benzoesäure beträgt hier (wie auch bei den anderen Versuchen, in denen das Glykokoll in kleinerem Zeitabstande nach der Benzoesäure eingeführt wurde) mehr als 0,8 g pro Kilo, woraus Cohn folgert, daß zur Zeit der Glykokollinjektion noch freie Benzoesäure in Zirkulation war. Meine Versuche mit der 0,8-pro Kilo-Dosis per os zeigen bei der direkten Bestimmung, daß zwar die Ausscheidungsdauer der gebundenen Benzoesäure (bei dieser Dosis) länger als 24 Stunden andauert, die freie Benzoesäure dagegen in 24 Stunden vollständig ausgeschieden ist. Wiewohl in Cohns und meinen Versuchen die Benzoesäuregaben verschieden waren, so lassen doch jene sowohl wie die erwähnten Versuche von Wiener die Deutung zu, daß die betreffenden Tiere auch ohne Eingriff mehr als 0,8 g gebundene Benzoesäure pro Kilo ausgeschieden hätten. Außerdem teilt aber Wiener[105]) in seiner Erwiderung an Cohn selbst 2 Versuche an einem 1600 g-Kaninchen mit, in welchen nach 1,05 und 1,59 g Benzoesäure pro Kilo per os 0,93 und 1,03 gebundene Benzoesäure pro Kilo ausgeschieden wurden. Hiernach dürfte die vermutete Konstanz des Synthesenumfanges der Hippursäure verschiedener Tiere auch für die Darreichung per os von 1,05 und 1,59 g Benzoesäure pro Kilo jedenfalls nicht immer Geltung haben.

Hingegen scheint, soweit man aus einem Versuche einen Schluß ziehen kann, der Umfang der Hippursäuresynthese pro Kilo Tier bei demselben Individuum bei gleichmäßiger Zufuhr

pro Kilo konstant zu sein. In Versuch XVI, Tab. XXIII, in welchem durch mehrere Tage stets 0,8 Benzoesäure pro Kilo gereicht wurde, wurde mit Ausnahme des ersten Tages stets fast die gleiche Hippursäuremenge pro Kilo ausgeschieden. Eine Berechnung pro Kilo ist am selben Tiere auch nach der Feststellung von E. Voit (vgl. oben S. 209) möglich, solange sich der Ernährungszustand nicht wesentlich ändert.

Tabelle XXIII.
Kaninchen Nr. XVI.

Datum	Gewicht	Als Na-Salz subk. zugeführte Benzoesäure = 0,8 p. K. Tier	Ausgeschiedene Hippursäure als Benzoesäure		Defizit
			in toto	p. K.	
20. IV. 04	1970	1,57			
21. IV.	1870	1,49	1,47	0,75	0,05
22. IV.	1790	1,43	1,31	0,70	0,06
23. IV.	1820	1,46	1,20	0,67	0,08
24. IV.	1800	1,44	1,24	0,68	0,06
25. IV.	1760	1,41	1,24	0,69	0,05
26. IV.	1700	1,34	1,21	0,69	0,08
27. IV.	1620	1,30	1,11	0,65	0,08
28. IV.	1530		1,07	0,66	0,07

Über die Abhängigkeit der Größe des Synthesenumfanges von anderen individuellen oder experimentell gesetzten Verhältnissen geben zunächst die eben gemachten Ausführungen über deren Inkonstanz Aufschluß. Der letzte von Wiener zitierte Versuch zeigt, daß der Synthesenumfang auch jenseits der 1,0 pro Kilo-Dosis mit der Menge der zugeführten Benzoesäure wächst, welches Verhalten für die unter 1,0 pro Kilo liegenden Dosen bereits in der ersten Arbeit von Wiener festgestellt wird. In welcher Weise nun die Größe der zugeführten Benzoesäuregabe die Größe der Synthese beeinflußt, kann aus folgendem geschlossen werden. Parker und Lusk, sowie Cohn[21]) erhielten erheblich mehr Benzoesäure, wenn die Zufuhr nicht auf einmal, sondern in refracta dosi über 12 bis 24 Stunden verteilt, erfolgte, als Wiener bei einmaliger Zufuhr gleicher Mengen; ferner wird selbst nach sehr kleinen Benzoesäuredosen neben Hippursäure auch stets freie Benzoesäure ausgeschieden (vgl. Cohn und meinen Versuch

Nr. 11), wiewohl das gleiche Tier bei größerer Dosis weit mehr Hippursäure zu bilden vermag (Versuch 11), schließlich paarte mein Kaninchen Nr. 11 die gleiche Dosis weit besser nach Darreichung per os als nach subkutaner Applikation. Die über 24 Stunden hinaus sich erstreckende Hippursäureausscheidung in diesem Versuche bei Darreichung per os, während bei subkutaner Applikation nach 12 Stunden keine Hippursäure mehr ausgeschieden wird, läßt den Schluß zu, daß auch die Ausscheidung der freien Benzoesäure sich nach stomachaler Einführung über einen längeren Zeitraum erstreckt als nach subkutaner. Hiernach muß nach Einführung in den Magen die Benzoesäure länger im Blute kreisen als nach subkutaner Injektion; das gleiche gilt von der sukzessiven Einverleibung nach Parker und Lusk und Cohn im Vergleich mit der einmaligen Zufuhr gleicher Mengen nach Wiener. Die verschieden lange Ausscheidungsdauer dürfte auch die Ursache dafür sein, daß nach kleineren Dosen vom selben Tiere weniger Hippursäure ausgeschieden wird als nach großen, und auch bei kleinen Dosen stets noch ungepaarte Benzoesäuremengen ausgeschieden werden, ein Verhalten, welches bis an die Grenze der tödlichen Dosis (1,59 pro Kilo im Versuche Wiener[105]) — tödliche Dosis 1,7 pro Kilo) Giltigkeit hat. Die Ausscheidungsdauer wächst aber offenbar nicht in gleichem Umfange wie die Steigerung der Dosis, daher findet man bei höheren Dosen auch eine Vermehrung der freien Benzoesäure im Harne.

Der Umfang der Hippursäuresynthese des Kaninchens hängt also von der Zeitdauer ab, innerhalb welcher eingeführte Benzoesäure im Körper zirkuliert.

Ferner war daran zu denken, daß der Synthesenumfang von der Mächtigkeit des Eiweißstoffwechsels der einzelnen Tiere abhängen könnte. Meine Kaninchen zeigten, nachdem sie wenige Tage auf reine Haferdiät gesetzt waren, meist eine konstante Stickstoffausscheidung in 24 Stunden. (Tiere, bei denen eine konstante Stickstoffausfuhr nicht beobachtet werden konnte, habe ich grundsätzlich von meinen Versuchen ausgeschlossen.) Die Stickstoffausscheidung zeigt nun ebensowenig eine klare Beziehung zum Körpergewicht als der Umfang der Hippursäuresynthese. Vergleicht man die Höhe der Stickstoffausscheidung und die Größe der Hippursäuresynthese der einzelnen Tiere, so ergibt sich durchaus kein Parallelismus zwischen beiden, so daß man von einer direkten Abhängigkeit des Synthesenumfanges von der Größe des Eiweißstoffwechsels nicht sprechen kann. (Tabelle XXIV.)

Tabelle XXIV.

Versuch Nr.	Gewicht	Normale 24h Stickstoffausscheidung p. Kilo Tier	p. K. Ausscheidg. d. geb. Benzoesäure nach subkut. Zufuhr v. 0,8 pro Kilo Benzoesäure	Bemerkungen
VII.	800	0,89	0,30	
VI.	1320	0,75	0,58	
V.	1370	0,50	0,33	
I.	1900	0,50	0,64	
II.	1770	0,49	0,47	Normalwert für gebundene Benzoesäure nicht bestimmt.
XIV.	2090	0,48	0,65	0,78 Benzoesäure pro Kilo gegeben.
XI.	2150	0,47	0,57	
VIII.	1850	0,46	0,60	
X.	2250	0,38	0,69	0,77 Benzoesäure pro Kilo gegeben.
XVI.	1970	0,36	0,75	
III.	2360	0,35	0,36	Normalwert f. gebundene Benzoesäure nicht bestimmt.
IV.	1760	0,34	0,58	

Schließlich muß offenbar die Größe der Synthese von der im Körper zur Verfügung stehenden Glykokollmenge abhängig sein. Diese Abhängigkeit spricht sich in den Versuchen von Wiener[104]) deutlich aus; wiewohl auch diese Versuche unter Zugrundelegung des irrtümlich angenommenen Maximalumfanges der Synthese (0,8 g gebundene Benzoesäure pro Kilo) beurteilt werden, sind die beobachteten Ausschläge doch so groß, daß man sie dafür als beweisend ansehen kann, daß der Synthesenumfang mit der Menge des im Körper vorhandenen Glykokolls zunimmt. Mit Rücksicht auf diese Abhängigkeit von Glykokollmenge und Hippursäuresynthese war es von Interesse, den zeitlichen Verlauf des Synthesenumfanges zu studieren und festzustellen, ob durch wiederholte Benzoesäurezufuhr der Synthesenumfang eine Beeinflussung erfährt. Was zunächst den letzteren Punkt anlangt, so zeigt der Versuch XVI in Tabelle XXIII, daß sich auch bei oft wiederholter Benzoesäureinjektion von der zweiten Injektion ab der Synthesenumfang

nicht ändert, doch wird bemerkenswerter Weise am ersten Versuchstage deutlich mehr Hippursäure ausgeschieden als an den folgenden. Das gleiche schließen Parker und Lusk aus dem meist deutlich kleineren Quotienten $\frac{\text{Gesamtstickstoff}}{\text{Hippurstickstoff}}$ an dem ersten Tage der Benzoesäuredarreichung, doch ist ihr Schluß, daß es sich hierbei um eine Ausschwemmung eines „surplus" oder „excess" von Glykokoll handelt, nicht zwingend, weil, wie wir gesehen haben, die Stickstoffsteigerung nach Benzoesäure häufig erst am zweiten Tage einsetzt und das oben angeführte Verhältnis ebenso durch den Zähler beeinflußt wird. Bezüglich des zeitlichen Verlaufes des Synthesenumfanges bieten der Versuch Nr. 2 in Tabelle X sowie der Versuch Nr. 12 in Tabelle XXV einigen Aufschluß. In Versuch 2.) wurde nach einmaliger subkutaner Injektion, in Versuch Nr. 12 während (kontinuierlicher) alle 10 Minuten vorgenommener intravenöser Injektion die dreistündige Ausscheidung verfolgt.

Tabelle XXV.

Kaninchen Nr. 12, 2060 g.*)

Zeit	Freie Benzoesäure	gebund. Benzoesäure	Gesamtstickstoff	Zufuhr
26. V. 7h a. m. 1903				
27. V. 7h a. m.	0,006	0,033	0,3398	
10h a. m.	0,007	0,259	0,1567	0,464 Benzoesäure als Na-Salz gegeben.
1h p. m.	0,012	0,357	0,1554	0,438 Benzoesäure als Na-Salz gegeben.
4h p. m.	verloren	gegangen	0,1568	0,464 Benzoesäure als Na-Salz gegeben.
7h p. m.	0,034	0,283	0,1421	0,464 Benzoesäure als Na-Salz gegeben.
10h p. m.	0,023	0,238	0,1225	
28. V. 10h a. m.	0,002	0,142	0,8274	

*) 26. V. 03. Harn von 7h a. m. abgegrenzt. 27. V. 7h a. m. desgleichen. Reaktion sauer. Das Tier wird aufgespannt, in die Ven. jug.

Nun lassen sich zwar die in gleichen Zeiten ausgeschiedenen Benzoesäure- und Hippursäuremengen nicht direkt mit einander vergleichen, weil die Hippursäureausscheidung im allgemeinen bei der verwendeten Dosis und dem Konzentrationsgrade bei jeder 3 Stunden-Periode um 1 Stunde im Rückstande ist (streng genommen müßte man die 3., 6., 9. Stunde der Benzoesäureausscheidung mit der 4., 8., 12. Stunde der Hippursäureausscheidung vergleichen), doch hat dieser Einwand keine Bedeutung für die Abstraktion, daß in beiden Versuchen die 3 Stunden-Ausscheidung der freien Benzoesäure zunächst eine Zunahme zeigt, ehe sie abklingt; besonders beweisend ist hierin Versuch Nr. 12, weil hier, wie die vorletzte Versuchsperiode zeigt, die Ausscheidung der einer Injektionsperiode entsprechenden Menge freier Benzoesäure am Ende der nächsten 3 Stunden-Versuchsperiode bereits beendet ist. Daß man aber auch in Versuch Nr. 2 die stärkere Ausscheidung von freier Benzoesäure in der zweiten Versuchsperiode nicht etwa auf eine verlangsamte Resorption beziehen darf, beweist der Verlauf der Hippursäureausscheidung, welche in der ersten Versuchsperiode am umfangreichsten ist. Eine kleine Rechnung, durch die man die 3 Stunden-Hippursäurewerte auf 4stündige bringt, zeigt übrigens, daß das in den Tabellen ersichtliche Größenverhältnis der einzelnen Werte für gebundene Benzoesäure hierdurch keine Änderung der Richtung erfährt, im Gegenteil die Differenzen in dem durch die Tabelle gegebenen Sinne noch deutlicher werden.

Die Hippursäureausscheidung zeigt so in Versuch 2.) eine kontinuierliche Abnahme, in Versuch 12 zunächst eine Zunahme und hierauf zur selben Zeit eine Abnahme, in welcher die freie Benzoesäure eine Zunahme erkennen läßt. Hieraus folgt, daß der Umfang der Hippursäuresynthese zu Beginn der Benzoesäurezirkulation größer ist als später, daß er sich nach diesem anfänglichen Höchststande im weiteren Verlaufe auf ein etwas niedrigeres aber beim selben Tiere konstantes Niveau einstellt, in dem er auch durch viele Tage lang fortgesetzte Zufuhr nicht herabgedrückt, oder überhaupt geändert werden kann.

---

eine Kanüle eingebunden und mittels Bürette alle 10 Minuten 0,8 ccm der Lösung III (5 ccm = 0,1919 Trocken-Rückstand mit 0,164 ätherlöslicher Säure) injiziert. Die Injektion dauert 12 Stunden. Hierauf wird noch eine 3stündige Nachperiode abgewartet und dann das Tier abgespannt. Der Harn wird mittels Verweilkatheter gesammelt und alle 3 Stunden abgegrenzt. Der Harn, der der Nachperiode folgenden 12 Stunden wird ebenfalls analysiert. Die Normalausscheidung ist bei der Berechnung der Werte nicht berücksichtigt.

Resumiere ich die im vorangehenden gezogenen Schlüsse, so ergibt sich: Der Umfang der Hippursäuresynthese steht in keinem direkten Abhängigkeitsverhältnis vom Körpergewicht und der Größe des Eiweißstoffwechsels, dagegen schwankt er gleichsinnig mit der Zeitdauer der Benzoesäurezirkulation und der im Körper vorhandenen Glykokollmenge. Da der Synthesenumfang auch unter gleichmäßigen Ernährungsbedingungen und unter Versuchsverhältnissen, welche eine gleiche Zeitdauer der Benzoesäurezirkulation gewährleisten, nach jeder Richtung hin bei verschiedenen Tieren inkonstant ist, und außerdem der Akt der Synthese selbst im Kaninchen nicht quantitativ verläuft, ist der Schluß gerechtfertigt, daß neben der zur Verfügung stehenden Glykokollmenge in letzter Linie die individuell verschieden starke synthetische Kraft den Umfang der Hippursäuresynthese im Kaninchenorganismus bestimmt.

Bei diesem Sachverhalte mangelt es durchaus an einem Kriterium, welches irgend einen beobachteten Hippursäuresynthesenumfang als normal oder irgendwie abweichend erkennen läßt. Es bleibt daher fortan nichts anderes übrig als beim Studium der Beeinflussung des Synthesenumfanges durch einen vorausgehenden Vorversuch am selben Tiere das normale Ausmaß der Hippursäuresynthese für dieses Tier zu bestimmen. Hierbei muß auf die Beziehungen Bedacht genommen werden, welche nach dem Ausgeführten zwischen Zeitdauer der Benzoesäurezirkulation und Zahl der Gaben einerseits und dem Synthesenumfange andererseits bestehen. D. h. meist wird es notwendig sein, als Normalwert erst den anzusehen, der sich aus einer 24 Stunden nach einer ersten vorgenommenen zweiten Benzoesäurezufuhr ergibt, und ferner ist es unumgänglich, im Haupt- und Vorversuche gleiche Dosen pro Kilo in einer Weise zuzuführen, welche eine in beiden Versuchen gleichmäßige Dauer der Benzoesäurezirkulation garantieren (gleiche Konzentration und Injektion unter die Haut oder intravenös). Die pro Kilo Versuchstier berechneten Hippursäurewerte werden dann in jeder Beziehung vergleichbar sein und beobachtete Schwankungen der Synthese nur noch von einer Änderung der synthetischen Energie oder einer Änderung des Glykokollbestandes des Tieres abhängen.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten im gegebenen Falle zu entscheiden, wird es notwendig, durch zwei weitere Versuche am selben oder an einem anderen Tiere, die unter den gleichen Vorsichtsmaßregeln auszuführen wären, die Wirkung

gleicher Glykokollmengen auf den Synthesenumfang der gleichen Benzoesäuredosis im Vorversuch und Hauptversuch (beeinflußtes Tier) festzustellen und so ein Bild über eventuelle Veränderung der synthetischen Energie durch den Eingriff zu erhalten. Hierbei ist die Annahme gemacht, daß ein und dasselbe Tier stets den gleichen, seiner individuellen synthetischen Energie entsprechenden Bruchteil gleichzeitig mit Benzoesäure eingeführten Glykokolls (gleiche Dosen vorausgesetzt) paart. Ein experimenteller Beweis für diese Annahme steht noch aus. Dahin gerichtete Versuchsreihen könnten auch eine Grundlage für die Beurteilung der Synthesenenergie überhaupt liefern, indem sie die Gesetze kennen lernen ließen, welche die Größe des paarungsfähigen Bruchteils eingeführten Glykokolls bestimmen. — Unter diesen Gesichtspunkten sind alle in der Literatur mitgeteilten Versuche über die Beeinflussung der Hippursäuresynthese zu beurteilen. Der Versuchsanordnung, in einem Vorversuche den normalen Synthesenumfang zu bestimmen, bedienten sich, wenn auch nicht unter den abgeleiteten notwendigen Kautelen, bloß Weyl und Anrep, Araki und Katsuyama. Weyl und Anrep fanden so den Synthesenumfang im Fieber herabgesetzt, das gleiche fanden für die CO-Vergiftung einerseits Araki, andererseits Katsuyama. Eigentlich beweisend sind bloß die Versuche des letzteren, da Araki in zwei Versuchen bloß die Ausscheidung der freien Benzoesäure und nur in einem dritten auch die Hippursäureausscheidung bestimmte, übrigens im Hauptversuche mehr Benzoesäure zuführte als im Vorversuche. Da schon früher Hofmann gezeigt hat, daß bei Verwendung von CO-haltigem Blute die Hundeniere Benzoesäure und Glykokoll nicht zu paaren vermag, ist es als erwiesen zu betrachten, daß bei CO-Vergiftung der Synthesenumfang durch Hemmung des synthetischen Aktes herabgesetzt ist. Das gleiche haben die Versuche von Hoffmann[28]) bei Verwendung von chininhaltigem Blute und die Versuche von Hauser*) bei Verwendung von phosphorhaltigem Blute an der durchströmten überlebenden Hundeniere gezeigt. Hingegen können die Versuche von Jaarsveld und Stokvis[31]), Kronecker[43]), Wiener[104]) und Cohn[21]) eine Beeinflussung des Synthesenumfanges noch nicht beweisen. Die Versuche von Jaarsveld und Stokvis sowie von Kronecker über die Herabsetzung des Synthesenumfanges bei Nierenkranken stützen sich auf die Beobachtung, daß Menschen nach Benzoesäuregenuß nur Hippursäure aus-

*) Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmakologie **36**, 175 (1895).

scheiden und sind überdies vor der Entdeckung der passiven Hippursäurespaltung in alkalischen und eiweißhaltigen Harnen durch van de Velde und Stokvis[39]) angestellt worden; eine Herabsetzung des Synthesenumfanges bei nierenkranken Menschen (wiewohl van de Velde und Stokvis einen Teil der Versuche von ihrem Standpunkte gelten lassen) kann mithin noch nicht als sichergestellt betrachtet werden. Ebenso bedürfen die Versuche von Wiener[104]) und Cohn[21]) über die Steigerung des Synthesenumfanges der Kaninchen nach Zufuhr von Harnsäure (Wiener), Leucin (Wiener, von Cohn nicht bestätigt), Gelatine (Cohn), welche unter der Annahme eines konstanten Synthesenumfanges (Wiener) gemacht worden sind, einer Wiederholung unter den angegebenen Vorsichtsmaßregeln.

III. Das Glykokoll als intermediäres Stoffwechselprodukt.

Das Glykokoll wurde bisher im tierischen Organismus gefunden: in der Hippursäure (Dessaingnes cit. n. Spiro loc. cit.), in der Glykocholsäure der Galle (Strecker cit. n. Spiro loc. cit.), im Kaumuskel von Pecten irradians und P. opercularis (Chittenden cit. n. Spiro loc. cit. A. Kelly, diese Beitr. 5, 382), ferner im Harne bei der experimentellen P-Intoxikation der Kaninchen [Abderhalden und Bergell[2])] und bei der menschlichen Gicht [Jgnatowski[30])], außerdem in der Hippursäure analogen Verbindungen im Harne nach Genuß gewisser aromatischer Säuren oder Verbindungen, die beim Durchgang durch den Körper in diese Säuren verwandelt werden, schließlich als Spaltungsprodukt bei der Hydrolyse zahlreicher tierischer Proteinstoffe: neben Leim, Elastin, Horn, Seide, Spongin, Conchiolin im Fibrin und Fibrinogen [Spiro[93])], Serum-Eiweiße des Menschen und Serumglobulin (Abderhalden und Falta, Heteroalbumose aus Syntonin und Fibrin (Wittepepton) [Spiro[93])]; dagegen nicht im Kasein [Spiro[93])], Globin aus Oxyhämoglobin und Serumalbumin (Abderhalden) sowie Protalbumose aus Syntonin [Spiro[93])]; außerdem wurde Glykokoll bei der Autolyse der Hundeleber von Jacoby[33]) gefunden.

Über die Rolle, welche dem Glykokoll im Stoffwechsel zu spielen zufällt, bzw. seine Abstammung sind verschiedene Vermutungen geäußert worden. Es wurde sowohl als intermediäres Spaltungsprodukt von Eiweißsubstanzen [Cohn[21])] als von Aminosäuren [Umber[98])] oder der Harnsäure [Wiener[106])] angesprochen; ferner besteht die Möglichkeit, daß die Quelle des Glykokolls die im Darmkanal zerfallenden Nahrungseiweiße sind; ja auch an die Möglichkeit einer synthetischen Entstehung aus

—CH_2—COOH- und NH_2-Gruppen [Spiro[33])] bzw. Essigsäure und Ammoniak (Parker und Lusk) wurde gedacht. Was insbesondere die Herkunft des Glykokolls bei der Benzoesäureintoxikation anlangt, bezogen Kühne und Hallwachs jene zum Teile wenigstens auf die Galle, Wiener[104]) schloß dann auf Grund seines „geringen und konstanten Glykokollvorrates" eine direkte Beziehung desselben zum Eiweißabbau aus, während Cohn[21]) im Hinblicke auf den bei seiner Versuchsanordnung größeren Umfang der Hippursäuresynthese und unter Berücksichtigung des Umstandes, daß sie nicht quantitativ verläuft, die Ansicht vertritt, daß die bei Benzoesäureintoxikation zur Ausscheidung kommenden Glykokollquantitäten so groß seien, daß sie sehr wohl eine wichtige Rolle beim Eiweißstoffwechsel spielen könnten. O. Zimmermann[107]) vermutete nach Benzoesäureversuchen an einer Patientin mit Gallenfistel als einzige Glykokollquelle die Galle, Rosenberg[66]) zeigte jedoch, daß auch der gallenfreie Hund nach Benzoesäurefütterung Hippursäure ausscheidet. Cohn[21]) hat auch vermutungsweise die Frage aufgeworfen, ob das Hippursäureglykokoll nach Benzoesäurezufuhr nicht dem durch diese gesteigerten Stoffzerfall seine Entstehung verdanken und so eigentlich ein pathologisches Produkt sein könnte. Salkowski[71]), der sich die gleiche Frage vorlegt, weist eine solche Annahme mit dem Hinweise ab, daß gerade Tiere, die viel Glykokoll zur Paarung beistellen, keine vermehrte Stickstoffausscheidung im Harne zeigen. Wenn auch diese Überlegung wegen der Stoffwechselwirkung auch der Hippursäure mindestens für Kaninchen nicht möglich ist, wie aus den Ausführungen auf S. 214f. hervorgeht, so ergibt sich doch aus allen meinen Versuchen eine Unabhängigkeit der Glykokollausfuhr von der beobachteten Stoffwechselwirkung unter den gleichmäßigsten Versuchsbedingungen nicht nur bei verschiedenen Tieren, sondern auch beim selben Individuum (vgl. Tab. IV, V u. XXIII); übrigens widerlegen alle Versuche, in denen die Stickstoffsteigerung ausbleibt oder verspätet eintritt, diese Anschauung.

Was Wiener[104]) über das Glykokollmaximum der Kaninchen mitgeteilt hat, konnte Veranlassung geben, sich diesen Glykokollvorrat als eine Art Depot vorzustellen, zumal der Autor selbst gelegentlich der Besprechung eines Versuches von Cohn[21]) davon spricht[106]), daß hier der Glykokollvorrat „erschöpft" gewesen sein könnte. Die Prüfung dieser Anschauung hat die oben mitgeteilten Versuche über den zeitlichen Verlauf des Synthesenumfanges veranlaßt und gezeigt, daß selbst bei wiederholter Zufuhr es auch nicht annäherungsweise gelingt, die Hippursäure

zugunsten der Benzoesäure im Harne zum Verschwinden zu bringen. Doch ergab sich nichtsdestoweniger, daß die Synthese zu Beginn eines Versuches oder am ersten Tage einer längeren Reihe deutlich ausgiebiger ist als später. Da es sich hier um Versuche an denselben Individuen unter ganz gleichmäßigen Bedingungen handelt, kann man (will man nicht zeitliche Schwankungen der synthetischen Energie annehmen) diese Befunde nur so deuten, daß die Tiere zu Beginn der Versuche mehr Glykokoll zur Verfügung haben als später, wo deren Glykokollausfuhr ein konstantes Niveau erreicht; auch Versuch 11b, welcher zeigt, daß kleine Benzoesäuregaben besser gepaart werden als große, läßt sich in diesem Sinne verwerten. Dieses Glykokollplus macht durchaus den Eindruck, als ob an irgend einer Stelle des Körpers ein allerdings kleines, rasch erschöpfbares Glykokolldepot vorhanden wäre. Diese Stelle ist möglicherweise die Leber und die Glykocholsäure die Quelle jenes Glykokollüberschusses, der sich im Anfange der mitgeteilten Versuche geltend macht. Es ist denkbar, daß die Benzoesäure zunächst das sonst zur Cholsäurepaarung verfügbare Glykokoll bindet. Hiernach müßte der Glykokollgehalt der Galle durch Benzoesäurezufuhr ebenso erschöpfbar sein, wie deren Tauringehalt durch Cholsäurefütterung nach v. Bergmann[12]) rasch erschöpft werden kann; und da hierdurch Cholsäure im Überschuß verfügbar würde, müßte analog den Versuchen von v. Bergmann der Schwefelgehalt der Galle nach Benzoesäurezufuhr zunehmen. Jedenfalls müssen sich Cholsäure und Benzoesäure bei der Glykokollbindung Konkurrenz machen, was auch in einem Versuche deutlich zum Ausdruck kam, in welchem ich nach einem Vorversuche gleichzeitig mit Benzoesäure Cholsäure eingeführt habe; die Glykokollausfuhr im Harne wurde bedeutend herabgesetzt.*) (Siehe Fußnotentabelle auf folgender Seite.)

Das bei Benzoesäureintoxikation ausgeschiedene Glykokoll entstammt zum größten Teile also weder einem Depot noch ist es ein Produkt des pathologischen (gesteigerten) Stoffzerfalles. Es erübrigt sonach nur die Diskussion darüber, inwiefern die Feststellungen, die in dem vorangehenden über die Gesetzmäßigkeiten der Hippursäuresynthese gemacht worden sind, eine Entscheidung unter den übrigen angeführten Abstammungsmöglichkeiten des Glykokolls gestatten. Läßt man zunächst die theoretische Möglichkeit einer synthetischen Entstehung außer Betracht und bedenkt, daß auch das hungernde Kaninchen reichlich Glykokoll bildet [Parker und Lusk (loc. cit.)], die Zerlegung von Nahrungseiweiß

im Darm also die Quelle des Glykokolls nicht sein kann, so verbleibt als mögliche Glykokollquelle nur der normale intermediäre Stoffwechsel. Dieser Schluß bestätigt sich experimentell durch die Tatsache, daß Kaninchen fortwährend, unerschöpflich Glykokoll produzieren, indem der Synthesenumfang am selben Tiere unter gleichen Bedingungen (gleiche synthetische Energie und gleiche Dosis) mit der Dauer der Benzoesäurezirkulation wächst und bei tagelanger regelmäßiger Vergiftung unverändert bleibt, was nach dem oben Ausgeführten nur auf eine gleichmäßige Glykokollproduktion zu beziehen ist. Ob und in welcher Weise der Eiweißkörper- oder Purinstoffwechsel als Glykokollquelle zu betrachten ist — maßgebend für die Beurteilung dieser Frage müssen die Glykokollquantitäten sein, welche im Vergleiche zum Gesamtstickstoffwechsel der Organismus entstehen läßt, und zweitens der Reichtum an Glykokollgruppen in den in Betracht kommenden Eiweißkörpern. Eine zahlenmäßige Angabe über die beim Hungerkaninchen gebildeten Glykokollmengen machen Parker und Lusk, welche berechnen, daß 4,65 Proz. des Gesamtstickstoffs im Hungerstoffwechsel als Glykokoll vorhanden sind. Die Berechnung geschieht aus dem Verhältnis von Gesamtstickstoff und gleichzeitig ausgeschiedenem Hippursäurestickstoff. Da die, auch in den Versuchen von Parker und Lusk gegebene Stoffwechselsteigerung durch Benzoesäure jedoch nicht zur Glykokollbildung führt, läßt sich das Verhältnis von Gesamtstickstoff zu Hippursäurestickstoff nicht ohne weiteres

---

*) Kaninchen Nr. XIV.

Datum	Gewicht g	Gesamt-Stickstoff in 24 h	Ausgeschieden in toto		Benzoesäure nach Abzug der Normalwerte		Zufuhr	
			freie	gebund.	freie	gebund.		
10. III. 04	2090							Vorversuch
11. III.	2090	0,995	0,016	0,073			1,64 Benzoesäure als Na-Salz subkut.	Vorversuch
12. III.	1970	1,361	0,231 0,202	1,427	0,21 0,19 } 0,20	1,35		Vorversuch
13. III.	1940	1,169	0,005	0,006				Vorversuch
14. III.	1950	1,113					1,64 Benzoesäure als Na-Salz subkut. + 0,5 Cholsäure als Na-Salz subkut.	Hauptversuch
15. III.	1850	1,232	0,281	0,953	0,27	0,88		Hauptversuch
16. III.	1850	1,244						Hauptversuch
17. III.	1815	1,133						Hauptversuch

dazu verwerten, den Bruchteil des normalen Stickstoffstoffwechsels zu bestimmen, welcher auf Glykokoll entfällt; die Zahl von Parker und Lusk muß schon an und für sich zu niedrig sein. Da aber außerdem die Ausscheidung der freien Benzoesäure wesentlich rascher erfolgt als die der Hippursäure, sich das ausgeschiedene Glykokoll jedoch nur auf die Zeit des Vorhandenseins freier Benzoesäure im Organismus beziehen kann, ist es von vornherein nicht angängig, die gleichzeitig ausgeschiedenen Mengen von Gesamtstickstoff und Hippursäurestickstoff zu vergleichen.

Nachdem oben gezeigt worden ist, daß die Hippursäuresynthese nicht quantitativ verläuft und ihr Umfang neben dem vorhandenen Glykokoll durch die individuell verschiedene synthetische Energie und die Dauer der Benzoesäurezirkulation im Blute bestimmt wird, mithin die beiden letzten Faktoren über jenen Teil des intermediär entstehenden Glykokolls entscheiden, welcher zur Ausscheidung als Hippursäure gezwungen werden kann, erscheint es unmöglich, durch die Bestimmung des Umfanges der Hippursäuresynthese unmittelbar eine Vorstellung über die Menge des intermediären Glykokolls zu gewinnen [worauf Cohn[22]) hinweist]. In ihrer gegenwärtigen Form gibt die Benzoesäuremethode nur Minimalwerte für jene Glykokollmengen, welche während der Zeit des Kreisens der Benzoesäure im Blute intermediär vorhanden sind. Will man nun diese Minimalwerte mit den entsprechenden Mengen des ausgeschiedenen Gesamtstickstoffs vergleichen, so kann das nur in der Weise geschehen, daß man jenen Bruchteil des ausgeschiedenen Gesamtstickstoffs in Rechnung setzt, welcher von dem 24 Stunden-Harne auf die Zeit des Kreisens der Benzoesäure entfällt. [Auf die Wichtigkeit der Zeit, innerhalb welcher die Benzoesäure zirkuliert, für die Bewertung der Benzoesäureversuche in der Glykokollfrage hat Cohn[22]) zuerst aufmerksam gemacht.] Andererseits muß man im Auge behalten, daß die durch Benzoesäurezufuhr hervorgerufene Stickstoffsteigerung nicht zu einer Steigerung der Hippursäuresynthese führt. Es ist oben berichtet worden, daß in nicht allzu seltenen Fällen eine Stickstoffsteigerung in der Periode der Ausscheidung von Benzoesäure und Hippursäure fehlt, ja daß manchmal in den ersten 24 Stunden nach erfolgter Applikation eine Verminderung der sonst gleichmäßig verlaufenden Stickstoffausscheidung zu beobachten ist. Ferner ist gezeigt worden, daß bei der angewendeten Dosis und subkutaner Darreichung sich die Ausscheidung in der 6. bis 9. Stunde vollendet. —

Berechnet man in solchen Versuchen ohne Stickstoffsteigerung am Versuchstage die jenen 8 Stunden entsprechenden Teile des Gesamtstickstoffs, so erhält man eine den Umfang des Stickstoffstoffwechsels richtig wiedergebende Vergleichszahl für die Bewertung der Menge des sich aus der Hippursäure-Benzoesäure berechnenden Glykokollstickstoffs. (Allerdings gilt dies nur unter Vernachlässigung des oben abgeleiteten kleinen Glykokolldepots, welches, wenn stets vorhanden, folgerichtig in Abzug gebracht werden müßte. Der hierdurch begangene Fehler fällt jedoch kaum ins Gewicht; nach Versuch XVI Tabelle XXIII wäre das Glykokolldepot z. B. höchstens 0,05 Benzoesäure äquivalent und entspräche einer Stickstoffmenge von 0,0057).

Die Ergebnisse meiner für diese Berechnung geeigneten Versuche gibt Tabelle XXVI; sie zeigt, daß bedeutende Bruchteile, *in einigen Versuchen mehr als die Hälfte, einmal sogar 64 Proz. des Gesamtstickstoffs als Glykokoll vorhanden gewesen sind.* Da die Werte für den Glykokollstickstoff jedoch nur Minimalwerte darstellen, ergibt sich die Auffassung, *daß normaler Weise der größere (vielleicht der größte) Teil des Harnstickstoffs ein Glykokollstadium durchläuft.* Dieser Schluß ist einer experimentellen Prüfung zugänglich. In Fällen, wo die Stoffwechselwirkung der

Tabelle XXVI.

Versuch Nr.	Gesamtstickstoff des Harnes			Ausgeschiedene gebundene Benzoesäure in toto	Stickstoff des ausg. Glykokolls	
	Vortag	Versuchstag			in toto*)	in % der 8 h N-Ausscheidung
		in toto	auf 8 h entfallen			
III.	0,8302	0,6528	**0,2176**	0,845	**0,0969**	45,45
IV.	0,6010	0,6037	**0,2012**	0,965	**0,1107**	55,0
V.	0,686	0,696	**0,252**	0,45	**0,0516**	21,7
VI.	0,988	0,528	**0,176**	0,76	**0,0871**	50,0
VII.	0,713	0,606	**0,202**	0,24	**0,0275**	15,0
X.	0,855	0,828	**0,276**	1,56	**0,1789**	64,3

Benzoesäure verzögert ist, müßte zur Zeit der Hippursäurebildung der Harnstoff im Harne zum größten Teile oder ganz zu Gunsten des Glykokolls verschwinden. Solche Versuche habe ich bereits in Angriff genommen. Die großen Glykokollmengen, welche dauernd im Kaninchenorganismus gebildet werden, können wohl nur dem Eiweißstoffwechsel im engeren Sinne ihren Ursprung verdanken

*) 1 g Benzoesäure entspricht 0,1147 Stickstoff.

und dürfte hierfür der Abbau der Purine nicht wesentlich in Frage kommen, nichtsdestoweniger sei darauf verwiesen, daß Bendix und Schittenhelm*) gezeigt hat, daß Kaninchen ganz erhebliche Harnsäuremengen zu zerlegen vermögen, und wir uns infolgedessen über die intermediär vorhandenen Harnsäuremengen keine Vorstellung bilden können. Andererseits dürfte es schwer fallen, diese großen Glykokollmengen von einer einfachen Hydrolyse der Eiweißkörper herzuleiten. Zwar resümiert Spiro[93]) bezüglich des Glykokollgehaltes der tierischen Eiweiße: „inwieweit das in diesen Eiweißkörpern (siehe oben) nachgewiesene Glykokoll auch quantitativ zur Bildung des als Glykocholsäure oder Hippursäure erscheinenden ausreicht, inwieweit es ferner als intermediäres Produkt bei der Harnstoffbildung fungiert, läßt sich auf Grund der obigen Methoden, welche nicht quantitativ sind, nicht entscheiden“, und außerdem wissen wir nichts über den Glykokollgehalt der Organe, doch erscheint die im Stoffwechsel gebildete Glykokollmenge so groß, daß die Vorstellung einer einfachen hydrolytischen Abspaltung mit unseren Kenntnissen über die sonst vorhandenen hydrolytisch abspaltbaren Glykokollmengen nicht recht vereinbart werden kann. Nehmen wir nach Tabelle XXVI an, daß nur die Hälfte des Harnstickstoffes über Glykokoll entstanden ist, so ergibt sich (den Eiweißstickstoff mit 16 Proz. angesetzt), daß aus 100 g im Körper zerfallendem Eiweiß 42,8 g Glykokoll entstehen. Ein solcher Prozentsatz müßte das Glykokoll bei der Hydrolyse in vitro unter dem gegenwärtigen methodischen Standpunkte derselben geradezu als Hauptprodukt erscheinen lassen. Hiernach kann man wohl schließen, daß der vitale Eiweißzerfall weitaus mehr Glykokoll entstehen läßt als der hydrolytische in vitro. Dies führt zu der Annahme, daß entweder der Eiweißabbau im Körper zwar zunächst dieselben Produkte ergibt wie die Hydrolyse in vitro, dieselben aber zum Teil weiter in Glykokoll übergehen, oder der Eiweißabbau in vitro durchaus anderer Art ist als die Säurespaltung im Glase. Zu der ersteren Annahme in Beziehung stehen Versuche, welche mittels der Methode der Benzoesäureintoxikation am Kaninchen einen eventuellen Übergang verschiedener dem Eiweiß entstammender Aminosäuren in Glykokoll während des Stoffwechsels entdecken sollten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind jedoch aus den oben angeführten Gründen (Seite 255) nicht geeignet gewesen die Frage zu entscheiden; hier müssen neue Versuche unter voller Berücksichtigung der ermittelten Gesetze der Hippursäuresynthese einsetzen. Solche Versuche

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **47**, 461 (1904).

werden dann auch Anhaltspunkte für die Beurteilung der zweiten Möglichkeit geben, welche nach dem eingangs erwähnten Befunde von Neuberg eine gewisse Wahrscheinlichkeit gewinnt.

Wie diese Frage aber auch in Zukunft wird beantwortet werden, das eine ergibt sich aus den mitgeteilten Versuchen mit Sicherheit, daß das Glykokoll beim Kaninchen Vorstufe eines großen (wenn nicht des größten) Teiles des ausgeschiedenen Harnstoffes ist. Dieses Ergebnis steht in scheinbarem Widerspruche zu den oben mitgeteilten Befunden, daß der Umfang der Hippursäuresynthese pro Kilo Tier durchaus unabhängig ist von der auf das Körpergewicht bezogenen Größe der Stickstoffausscheidung verschiedener Kaninchen. Dieser Widerspruch findet jedoch ausreichende Aufklärung in der oben aus anderen Befunden abgeleiteten Tatsache, daß die Energie der Hippursäuresynthese individuell innerhalb weiter Grenzen schwankt. Eine andere Erklärung erfordert aber die Tatsache, daß der Umfang der Hippursäuresynthese weder beim selben Tiere noch auch bei verschiedenen Tieren in einer Abhängigkeit steht von der Größe der durch die Benzoesäure hervorgerufenen Vermehrung der Stickstoffausfuhr im Harne. Ein Anhaltspunkt dafür, daß die synthetische Energie auch beim selben Tiere Schwankungen unterworfen ist oder durch die Benzoesäure selbst beeinflußt werde, hat sich aus dem Dauerversuche Nr. XVI nicht ergeben, im Gegenteile zeigte sich ein konstanter Synthesenumfang bei durchaus gleichmäßigen Bedingungen. Es bleibt somit nur die eine Erklärungsmöglichkeit, daß der durch Benzoesäure verursachte pathologische Stoffzerfall im Gegensatz zum normalen nicht zum Auftreten von Glykokoll führt.

Die aus den mitgeteilten Versuchen sich ergebende große Bedeutung des Glykokolls im Stoffwechsel erfordert zweifellos noch eine Vertiefung der Versuche nicht nur in der Richtung der Beeinflussung der Harnstoffausscheidung durch Benzoesäureintoxikation, sondern auch in der Richtung der Wirkung verschiedenster Faktoren, welche den Eiweißstoffwechsel zu beeinflussen vermögen, auf den Umfang der Hippursäuresynthese.

IV. Methodik.

Die Darstellung und Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure aus Harn wird gewöhnlich erst nach vorausgehender Vorbehandlung desselben vorgenommen. Meist dient ein Alkoholauszug (bzw. unter Verwendung von Tierkohle hergestelltes Alkoholextrakt) als Ausgangsmaterial oder der Harn wird zu-

nächst mit Baryt von dem größten Teile seiner saueren Bestandteile befreit [Rem-Picci[64])]. Auch lassen sich beide Methoden wie ich mich überzeugt habe, mit Vorteil vereinigen, indem man den Harn in derselben Weise vorbereitet wie zur Harnstoffbestimmung nach Mörner-Sjöquist.

a) Bestimmung der Benzoesäure. Die Benzoesäure wird dem Harne durch Petroläther entzogen. Die Extraktion geschah bisher nicht direkt aus dem Harne sondern aus einem bei saurer Reaktion hergestellten, die gesamte Benzoe- und Hippursäure enthaltenden Essigäther- (bzw. Äther-Essigäther-) Extrakte. Da zum Verdampfen des Essigäthers meist höhere Temperaturen notwendig sind als Zimmertemperatur, können hierbei Verluste der so ungemein flüchtigen Benzoesäure eintreten. Ich habe mich davon überzeugt, daß die Benzoesäure selbst bei der Destillation von Äther oder Petroläther (Siedetemperatur 30° bis 60°) zum Teile in das Destillat übergeht. Ich habe deshalb die Abscheidung beider Säuren von vorneherein in zwei Zeiten vorgenommen, indem ich die Benzoesäure aus dem in wenig Wasser gelösten angesäuerten Alkoholextrakte mit Petroläther direkt ausgeschüttelt habe. Die so abgeschiedene Benzoesäure (einerlei ob sie direkt oder aus dem Essigätherextrakte isoliert wurde) ist nicht rein. Neben anderen organischen Säuren enthält sie noch Farbstoffe [Indigo (Jaarsveld und Stokvis), bisweilen ist der Petrolätherauszug insbesondere nach längerem Stehen des salzsauren Gemisches stark rot-violett gefärbt]. Manche Autoren [Weyl und Anrep (loc. cit.)] waschen die so dargestellte Benzoesäure mit Wasser, Rem-Picci schaltet von vorneherein durch die Barytfällung einen Teil der Säuren aus. Sehr gut wird die Benzoesäure durch Dampfstromdestillation gereinigt. Salkowski hat dieses Verfahren zuerst angewendet, später verwendeten es R. Meyer und H. Meyer*) zur quantitativen Bestimmung von Benzoylgruppen und Th. Pfeiffer, C. Bloch und R. Riecke[60]) zur Bestimmung der Gesamtbenzoesäure (Benzoesäure + Hippursäure) im Harne.

Mit der Benzoesäure gehen noch flüchtige Fettsäuren des Harnes in das Destillat [vgl. Schotten[86])], diese kann man, insbesondere die hohen Fettsäuren (vgl. Schotten), wenn man nicht von vorneherein nach Rem-Picci vorgegangen ist, durch vorherige Behandlung des Petrolätherauszuges mit $BaOH_2$-Lösung zum Teil entfernen. Doch auch hierbei verbleibt neben Fett-

*) B. B. 28, 2965.

säuren, welche lösliche Barytsalze bilden, ein Rest saurer Produkte, welcher manchmal in dünnen Fetzen auf dem Destillate schwimmt und durch Filtration leicht abgetrennt werden kann. Im Destillate kann die Benzoesäure nach Meyer-Meyer unter Rosolsäureanwendung direkt oder nach Pfeiffer, Bloch, Riecke nach Neutralisation, Eindampfen und Ausfällen mit bekannter Säuremenge indirekt maßanalytisch bestimmt werden. Für die Bestimmung im Harne kommt jedoch nur die Wägung nach nochmaliger Überführung der Benzoesäure in Petroläther in Betracht. Der Petroläther ist dem leichter flüchtigen Äther vorzuziehen, weil dieser selbst in tadelloser Qualität Wasser und mit diesem Spuren fremdartiger Substanzen weit mehr löst als Petroläther, insbesondere gilt das, wie Versuche gelehrt haben, für Essigsäure, in geringerem Grade jedoch, namentlich bei Gegenwart der letzteren, auch für Salze.

b) Bestimmung der Hippursäure. Liebig isolierte die Hippursäure durch Ausschütteln des Harns mit Äther. Bunge und Schmiedeberg[20]) führten hierfür den Essigäther ein. Die gleichzeitig abgeschiedene Benzoesäure wurde durch Petroläther entfernt. Die weitere Reinigung der rohen Säure geschah durch verschiedene Autoren in verschiedener Weise. Bunge und Schmiedeberg kristallisierten nach Kochen mit Tierkohle um, oder reinigten über das Zinksalz (zur Entfernung von die Kristallisation hemmender Milchsäure). Charles Fischer fällte aus der Essigätherlösung mit Chloroform die Hippursäure, Parker und Lusk verwendeten zu gleichem Zwecke Benzol, nachdem das Extrakt mit Wasser gewaschen war.

Jaarsveld und Stokvis brachten die nach Bunge und Schmiedeberg isolierte, aber nicht weiter gereinigte Hippursäure nach Verseifung durch Säure oder Alkali als Benzoesäure zur Wägung. Hierdurch werden alle sauren, in Essigäther löslichen, bei der Verseifung Benzoesäure liefernden Harnbestandteile als Hippursäure bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß die nach Benzoesäuregenuß auch beim Kaninchen gefundene reduzierende Substanz, die in Essigäther leicht löslich ist, keine Benzoesäure enthält, geben die Werte von Jaarsveld und Stokvis für „gebundene Benzoesäure" tatsächlich ein exaktes Maß für die ausgeschiedene Hippursäure. Blumenthal[18]) hat nach Salkowski[78]) den Stickstoffgehalt des gewaschenen Ätheralkoholauszuges zur Hippursäurebestimmung verwendet.

Vergleichende Untersuchungen über den Wert der einzelnen Methoden im Harne liegen nur wenig vor und oft genug wurde

der normale Gehalt des Harnes an Hippursäure unberücksichtigt gelassen. Die klassische Methode von Bunge und Schmiedeberg gibt bei irgend erheblichen Hippursäuremengen sehr gute Resultate (Schröder loc. cit. 94,2 bis 99,6 Proz.), läßt aber oft bei den sehr kleinen Hippursäuremengen des normalen (Kaninchen-) Harnes im Stiche, worauf Jaarsveld und Stokvis (loc. cit.) und Blumenthal (loc. cit.) hinweisen. Wenn auch die schlechten Resultate und die vermeintliche Verunreinigung mit Harnstoff (Jaarsveld und Stokvis) nur auf die nicht genaue Einhaltung der Bunge-Schmiedebergschen Vorschrift zurückzuführen waren [Schröder loc. cit. 325; Salkowski [77]) 371; Schmiedeberg [84])], so ist doch sicher, daß die Gegenwart von die Kristallisation hemmenden Stoffen gelegentlich zu falschen Resultaten führt. Über solche Erfahrungen berichtet R. Riecke [65]), und leitet hieraus die Forderung ab, daß die Hippursäure nur indirekt bestimmt werden sollte, „naturgemäß bedürfen alle mit direkten Bestimmungsmethoden gewonnenen Resultate der Nachprüfung“ (Ref. i. J. T. 33).

Die indirekte Hippursäurebestimmung nach Jaarsveld und Stokvis, welche seither viel Anwendung gefunden hat, gibt auch bei kleinsten Hippursäuremengen brauchbare Resultate, wiewohl die Überführung in die leichtflüchtige Benzoesäure ihrerseits die Gefahr von Verlusten in sich birgt, und andererseits die Möglichkeit der Mitbestimmung anderer Benzoesäure liefernder Harnbestandteile nicht ausgeschlossen ist (gepaarte Glykuronsäure?). Eine Nachprüfung von van de Velde und Stokvis beseitigte die erhobenen Einwände. Die indirekte Hippursäurebestimmung nach Blumenthal-Salkowski ist zwar nach neueren Mitteilungen von Blumenthal [19]) nicht mit den von Soetbeer [92]) behaupteten großen Fehlern behaftet, arbeitet aber mit einem Mindestverluste von 15 Proz., sodaß sie nur in ganz besonders geeigneten Fällen zu Vergleichszwecken Verwendung finden dürfte [vgl. auch Hupfer [29])].

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen habe ich bei meinen Versuchen zur Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure im Harne folgenden Weg eingeschlagen:

Der (stets sauer reagierende) Harn wurde mit Natriumkarbonat eben deutlich alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, mit Alkohol (die letzten Spuren mit Wasser) in einen Meßkolben von geeigneter Größe gespült, Alkohol bis fast zur Marke nachgegossen und 24 Stunden stehen gelassen, hierauf bis zur Marke aufgefüllt, durchgeschüttelt, rasch filtriert und vom Filtrate ein aliquoter Teil, der der Wahrscheinlichkeit nach nicht mehr als 0,3 bis 0,4 Gesamtbenzoesäure enthielt, mit Pipetten in Stöpselflaschen von entsprechendem Inhalt (bzw.

Hartglaskolben) abgefüllt. Der Alkohol dieser Extraktteile wurde auf dem Wasserbade unter Zuhilfenahme eines Luftstromes, der über den Flüssigkeitsspiegel gesaugt oder geblasen wurde, entfernt und der Rückstand in möglichst wenig Wasser (meist 5 ccm) gelöst.

Das weitere Vorgehen war verschieden, je nachdem die Gesamtbenzoesäure des Harnes oder worauf es vorzugsweise ankam, Benzoesäure und Hippursäure gesondert bestimmt werden sollten.

Im ersteren Falle kochte ich die wässerige Lösung unter Zusatz von starker Lauge mehrere Stunden unter Rückfluß (I), im letzteren Falle wurde mit Salzsäure angesäuert und zunächst die freie Benzoesäure 5mal mit je 20 ccm Petroläther (Siedetemperatur 30 bis 60°) ausgeschüttelt. Die einzelnen Petrolätherportionen wurden mittels eines am unteren Ende aufgebogenen Heberchens, welches nebst einem Mundstück (nach Art einer Spritzflasche) in einen passenden Korkstopfen montiert war, durch ein trockenes Filter in einen Schütteltrichter abgelassen. (Extraktionsflasche, Filter und Schütteltrichter sind hierbei übereinander an einem Universalgestell befestigt. Durch Anblasen des Mundstückes der Extraktionsflasche bringt man leicht die Flüssigkeit durch den Heber zum Ausfließen und schiebt diesen dann vorsichtig abwärts, bis sein aufgebogenes abgeschmolzenes Ende eben mit der Trennungsfläche zwischen Petroläther und wässeriger Schicht abschneidet. Die geringen Mengen Extrakt, die jedesmal in der Spitze des Hebers zurückbleiben, lassen sich leicht durch Ansaugen oder Ausblasen in die Flasche oder auf das Filter bringen. Nach jeder Extraktion werden alle Teile mit Petroläther abgespült.) Dann wurde das Petrolätherextrakt 5mal mit Barythydratlösung ausgeschüttelt, wobei meist eine flockige Fällung erfolgte, die Barytportionen in einen Hartglaskolben filtriert, Filter und Schütteltrichter nachgewaschen (II). Das bei dieser Manipulation ausfallende Baryumkarbonat stört in keiner Weise.

Die nach der Benzoesäureausschüttelung in der Extraktionsflasche zurückgebliebene, von ausgeschiedener Hippursäure mehr oder minder trübe Flüssigkeit wurde hierauf 5mal mit Essigäther ausgeschüttelt und die Extrakte mittels des Hebers durch dasselbe Filter, welches zur Filtration des Benzoesäurehaltigen Petroläthers gedient hatte, in derselben Weise in eine Porzellanschale abgelassen. Hierbei galt als Regel, das erste Mal solange und mit soviel Essigäther zu schütteln, daß die ganze ausgeschiedene Hippursäure gelöst und die wässerige Schicht klar geworden war. Leichte Trübungen der Ätherschichte (infolge partieller Emulsionierung) ließen sich stets durch wenige Tropfen Alkohol beseitigen. Die vereinigten Extrakte wurden an einem warmen Orte (30°)*) der Selbstverdunstung überlassen, die Rückstände mit starker Lauge in einen Hartglaskolben gespült und wie I verseift (III). — Dieser Teil der Bestimmung geht rasch von statten, die drei Ausschüttelungen beanspruchen kaum mehr Zeit als 1 Stunde. Das Abdunsten des Essigäthers dauert dagegen meist 12 Stunden. Es resultierten schließlich 3 Benzoesäurelösungen, I: Gesamtbenzoesäure; II: freie Benzoesäure; III: gebundene Benzoesäure. Sie wurden mit Phosphorsäure angesäuert und der Dampfstromdestillation unterworfen, indem 2 Liter Wasser unter normalem Drucke durchdestilliert wurden. Das Destillat tropfte durch ein Filterchen in eine entsprechende Menge Natrium-

*) Stadelmann (loc. cit.) hat darauf hingewiesen, daß bei höherer Temperatur durch aus Essigäther entstehende Essigsäure Hippursäure gespalten werden kann.

karbonatlösung. Nachdem die (alkalisch reagierenden) Destillate in Schalen bis fast zur Trockene eingedampft waren, wurde abermals in Extraktionsflaschen gespült und in derselben Weise wie früher 3mal mit Petroläther ausgezogen, die Extrakte in gewogene Kölbchen filtriert, der Petroläther durch einen (durch Schwefelsäure) getrockneten Luftstrom bei Zimmertemperatur entfernt und die zurückbleibende tadellos weiße Benzoesäure gewogen. Bei der Leichtflüchtigkeit der Benzoesäure ist es nur erwünscht, daß während des Blasens die Temperatur des Petroläthers bis unter 0° sinkt, sodaß sich die Wände der Kolben mit einer Eiskruste bedecken. Da der Petroläther so gut wie kein Wasser beim Ausschütteln aufnimmt, pflegte die zurückbleibende Benzoesäure, sobald der Geruch nach Petroläther verschwunden war, schon gewichtskonstant zu sein, andernfalls leitete ich noch 10 bis 15 Minuten getrocknete Luft durch die Kolben oder stellte sie für einige Stunden in den Schwefelsäureexikkator. Die an der Wage abgelesenen Werte wurden schließlich unter Vernachlässigung des Volumens der alkoholunlöslichen Harnbestandteile auf die Gesamtharnmenge umgerechnet und von dem Resultat die Normalausscheidung des betreffenden Tieres in Abzug gebracht.

Nachdem mittels dieser etwas umständlichen Methode die wichtigsten der oben mitgeteilten Tatsachen ermittelt waren, habe ich in späteren Versuchen das Verfahren gelegentlich dadurch abgekürzt, daß ich die Dampfstromdestillation umgangen habe. Hierbei macht man keinen Fehler, da durch die Analyse der abzuziehenden Normalausscheidung die Verunreinigungen der abgeschiedenen Säuren bestimmt werden. Bei diesem Vorgehen muß man aber die verseiften Proben I und III zunächst nach Ansäuren mit Schwefelsäure und Wiederalkalischmachen mit Karbonat mit Alkohol von den vielen Salzen befreien. Diese Extraktion geht rasch von statten, wenn man das Auswaschen der Salze auf dem Saugfilter vornimmt.*)

Als Beleg für die Brauchbarkeit der Methode sei nachstehendes angeführt:

Je 50 ccm eines frischen sauren Gemisches von Kaninchenharnen gaben in Parallelbestimmungen:

freie Benzoesäure 0,001 / 0,001 gebundene Benzoesäure 0,049 / 0,041

je 30 ccm eines Harngemisches a) ohne Zusatz, b) nach Zusatz von 0,201 freier und 0,146 als Hippursäure gebundener Benzoesäure gaben:

a) 0,012 freie Benzoesäure b) 0,215 freie Benzoesäure
0,013 gebundene Benzoesäure 0,150 gebundene Benzoesäure

nach Abzug der präexistenten Säuremengen:

freie Benzoesäure: zugesetzt 0,201 / gefunden 0,203

gebundene Benzoesäure: zugesetzt 0,146 / gefunden 0,137

Hiernach liegen die Fehler der Methode, bei Bestimmung von Mengen, wie sie in meinen Versuchen in Betracht kamen, in den Milligrammen, was das Ergebnis zahlreicher im Verlaufe der Versuche vorgenommener Parallelbestimmungen bestätigt hat. Wegen der notwendigen Umrechnung der Resultate auf das Gesamtharnvolumen vergrößert sich der Fehler des

*) In den oben mitgeteilten Tabellen sind nur die mit dem Vermerk „nicht destilliert“ so ausgeführt.

schließlichen Wertes meist um das 3fache, ich habe daher als mittlere Fehlergrenze die Zahl von $\pm$ 0,02 Benzoesäure angenommen und dementsprechend meine Resultate nur in 2 Dezimalstellen angegeben, sowie nur Ausschläge, welche höhere Werte als $\pm$ 0,02 erreichten, in Betracht gezogen.

Sämtliche Versuche wurden an männlichen, womöglich jungen Kaninchen ausgeführt. Nachdem die Tiere einige Tage in Glasglocken im Laboratorium bei ausschließlicher Haferfütterung zugebracht hatten, wurde ihre tägliche Stickstoffausscheidung im Harne kontrolliert. Nur solche Tiere wurden im allgemeinen zu Versuchen verwendet, welche konstante Stickstoffmengen im 24 Stunden-Harn ausschieden. Die Harnabgrenzung geschah durch Abdrücken, der letzte Rest wurde mittels Nelatonkatheter entleert und meist durch Blasenspülung die Abgrenzung vervollständigt. Im Hinblicke auf den Katheterismus sind junge Tiere vorzuziehen, da der Katheder bei älteren nicht selten hartnäckig in ein Samenbläschen eindringt und der Harn neben dem Katheder herausläuft, während sich dieser mit Sperma füllt. — Neben der Stickstoffausscheidung im Harne wurde das Volumen und die Reaktion desselben, das Körpergewicht, die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme*) und die Menge des abgesetzten Kotes**) in 24 Stunden-Perioden verfolgt. Vor Beginn des Versuches wurde an 1 bis 2 Tagen die normale Benzoesäure- und Hippursäureausscheidung bestimmt, um von den Werten der Versuchstage abgezogen zu werden.

Die Benzoesäure wurde den Tieren in etwa 4proz. Lösung mittels Bürette unter die Rückenhaut appliziert; wegen der Gefahr des Auftretens von Diarrhöen nie mehr als 0,8 pro Kilo Tier. — Meist wurde der Harn sogleich verarbeitet, hatte er aber irgend längere Zeit (etwa bis zum nächsten Tage) zu stehen, so wurde er mit Formol, Chloroform oder Alkohol versetzt im Eisschranke aufbewahrt (bei Zimmertemperatur schützt Formol die Hippursäure nur kurze Zeit vor Zersetzung). Das Entleeren des Harnes in den Käfig konnte durch öfteres Abdrücken meist vermieden werden. Nur sauer reagierende Harne wurden (entsprechend den Erfahrungen von van de Velde und Stokvis) untersucht; von wenigen seltenen Ausnahmen abgesehen entleerten meine Kaninchen stets sauren Harn. Den Schluß des Versuches bildete meist noch die Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure eines Nachtages.

Literaturnachweis.

[1]) Abderhalden, E. und Bergell, P., Der Abbau der Peptide im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 10 (1903). — [2]) Abderhalden, E. und Bergell, P., Über das Auftreten von Monaminosäuren im Harn von Kaninchen nach Phosphorvergiftung. Das. **39** (1903). — [3]) Abelous, J. E. et Ribaut, H., Sur l'existence d'un ferment soluble opérant la synthèse de l'acide hippurique aux dépens du glycocolle et de l'acide benzoïque. C. R. Soc. de Biol. 9. Juin 1900. — [4]) Araki, T., Über die chemische Änderung der Lebensprozesse infolge von Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chemie **19**, 423 (1894). — [5]) Baas, H. K. L., Über das Verhalten des Tyrosins zur Hippursäurebildung. Das. **11**, 485 (1887).

*) Durch Zurückwägen der Futterschalen unter Berücksichtigung der Wasserverdunstung.

**) Durch Wägung des lufttrockenen Kotes.

— [6]) Bashford, E. und Cramer, W., Über die Synthese der Hippursäure im Tierkörper. Vorläufige Mitteilung. Das. **35**, 224 (1902). — [7]) Baum, J., Eine einfache Methode zur künstlichen Darstellung von Hippursäure und ähnlich zusammengesetzten Verbindungen. Das. **9**, 465 (1885). — [8]) Baumann, E., Zur Kenntnis der aromatischen Substanzen des Tierkörpers. Das. **7**, 282 (1883). — [9]) Baumann, E., Zur Kenntnis der aromatischen Substanzen des Tierkörpers. Das. **7**, 553 (1883). — [10]) Baumann, E., Die aromatischen Verbindungen im Harne und die Darmfäulnis. Das. **10**, 123 (1885). — [11]) Baumann, E. und Herter, E., Synthese von Ätherschwefelsäuren und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Das. **1**, 244 (1877). — [12]) Bergmann, G. v., Überführung von Cystin in Taurin im tierischen Organismus. Diese Beiträge **4**, 192. — [13]) Bergmann, G. v., Notiz über den Befund von Verbindungen im Blute, die mit Naphtalin-sulfochlorid reagieren. Das. **6**, 40. — [14]) Bergmann, G. v. und Langstein, L., Über die Bedeutung des Reststickstoffes des Blutes für den Eiweißstoffwechsel unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Das. **6**, 27. — [15]) Berninzone, M. R., Sulla sintesi fisiologica dell'acido ippurico. Bolletino accad. med. di Genova **16**, Nr. 1 (1901). Zitiert nach Centralblatt f. Physiologie **15**, 830. — [16]) Blendermann, H., Zur Kenntnis der Bildung und Zersetzung des Tyrosins im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **6**, 234. — [17]) Blum, L., Über das Schicksal des Cystins im Tierkörper. Diese Beiträge **5**, 1 (1903). — [18]) Blumenthal, Ferd., Zur Methode der Hippursäurebestimmung. Zeitschr. f. klin. Medizin **40**, 339 bis 344. — [19]) Blumenthal, Ferd. und Braunstein, A., Über die quantitative Hippursäurebestimmung beim Menschen. Diese Beiträge **3**, 585 (1903). — [20]) Bunge, G. und Schmiedeberg, O., Über die Bildung der Hippursäure. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **6**, 233 (1877). — [21]) Cohn, R., Über den Glykokollvorrat des tierischen Organismus, ein Beitrag zur Frage des intermediären Stoffwechsels. Festschrift zur Feier des sechzigsten Geburtstages von Max Jaffe 321. — [22]) Cohn, R., Zur Frage des Glykokollvorrats im tierischen Organismus. Prager med. Wochenschrift **5**, 27 (1902). — [23]) Cohn, R., Zur Frage der Glykokollbildung aus Leucin im tierischen Organismus. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **48**, 177 (1902). — [24]) Cohn, R., Über das Verhalten des salzsauren Tyrosinäthyläthers im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **14**, 189 (1888). — [25]) Fischer, Ch. S., Über die quantitative Bestimmung des Glykokolls in den Zersetzungsprodukten der Gelatine. Das. **19**, 178 (1894). — [26]) Fischer, E., Levene und Aders, R. H., Über die Hydrolyse des Leims. Das. **35**, 70 (1902). — [27]) Götze, K. und Pfeiffer, Th., Beiträge zur Frage über die Bildung bzw. das Verhalten der Pentaglukosen im Pflanzen- und Tierkörper. Landwirtschaftliche Versuchsstation **47**, 59 bis 93. Zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie **26**, 804. — [28]) Hoffmann, A., Über die Hippursäurebildung in der Niere. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **7**, 233. — [29]) Hupfer, Fr., Einwirkung von Chinasäure auf Harnsäure- und Hippursäureausscheidung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 302 (1903). — [30]) Ignatowski, A., Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harne, vorzugsweise bei Gicht. Das. **42**, 371 (1904). — [31]) Jaarsveld, G. J. und Stokvis, B. I., Über den Einfluß von Nierenaffektionen auf die Bildung von Hippursäure. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **10**, 268 (1879). — [32]) Jaffé, M., Über das Verhalten des p-Dimethylaminobenzaldehyds im tierischen Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 374

(1905). — [33]) Jakoby, M., Über die fermentative Eiweißspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Das. **30**, 162 (1900). — [34]) Katsuyama, K., Über den Einfluß einiger Gifte auf die Synthese der Phenolschwefelsäure im tierischen Organismus. Das. **34**, 83 (1901). — [35]) Keller und Wöhler, L. Ann. **43**, 108 und **65**, 336. — [36]) Knieriem, Zeitschr. f. Biologie **10**, 263. — [37]) Knieriem, Das. **13**, 36. — [38]) Knoop, Fr., Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Diese Beiträge **6**, 150 (1904). — [39]) Kochs, Archiv f. d. ges. Physiol. **20**, 64 (1879). Zitiert nach Kobert. Schmidts Jahrbuch **185**, 113 (1880). — [40]) Kobert, Zur Kenntnis der Wirkung der Benzoesäure nach Versuchen mit Schulte. Das. 12. — [41]) Kumagawa, M., Über die Wirkung einiger antipyretischen Mittel auf den Eiweißumsatz im Organismus. Virchows Archiv **113**, 134 (1888). — [42]) Kühne und Hallwachs, Das. **12**, 386 (1857.) — [43]) Kronecker, Fr., Über die Hippursäurebildung beim Menschen in Krankheiten. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **16**, 344 (1883). — [44]) Lang, J., Über Desamidierung im Tierkörper. Diese Beiträge **5**, 321 (1904). — [45]) Lautemann, Annalen d. Chemie, zitiert nach Lewin. Zeitschr. f. klin. Medizin **42**, 371 (1901). — [46]) Lewin, Beiträge zum Hippursäurestoffwechsel des Menschen. Das. **42**, 371 (1901). — [47]) Lücke, Virchows Archiv 1860, S. 196, zitiert nach Lewin. Zeitschr. f. klin. Medizin **42**, 371 (1901). — [48]) Mattschewsky, Virchows Archiv 1863, S. 538, zitiert nach Lewin, loc. cit. — [49]) Meißner und Shepard, Untersuchungen über die Bildung der Hippursäure. Hannover 1866. Diese vielfach zitierte Arbeit ist mir nicht zugänglich gewesen. — [50]) Minkowski, O., Über Spaltungen im Tierkörper. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **17**, 445 (1883). — [51]) Nencki, L. v., Über das Verhalten einiger aromatischer Verbindungen im Tierkörper. Das. **1**, 420 (1873). — [52]) Nencki, M. u. Giacosa, P., Über die Oxydation der aromatischen Kohlenwasserstoffe im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie **4**, 325 (1880). — [53]) Neubauer, O. und Falta, W., Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkoptonurie. Das. **42**, 81 (1904). — [54]) Neuberg, C., Die Physiologie der Pentosen und der Glykuronsäure. Ergebnisse der Physiologie. Herausgegeben von Asher und Spiro. III. Jahrgang. Abteilung I, S. 372 (442). — [55]) Neuberg, C. und Langstein, Leo, Ein Fall von Desamidierung im Tierkörper zugleich ein Beitrag zur Frage nach der Herkunft des Glykogens. Archiv f. (Anatomie) und Physiologie 1903, Suppl., S. 514. Zitiert nach Centralblatt f. Physiologie 1903, S. 786. — [56]) Neuberg, C. und Löwy, A., Über Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 338. — [57]) Neuberg, C. und Richter, Über das Vorkommen freier Aminosäuren im Blut bei akuter gelber Leberatrophie. Deutsche med. Wochenschrift 1904, S. 498. — [58]) Noël-Paton, Journal of Anat. and Phys. **20**, 114. — [59]) Parker and Graham Lusk, On the Maximum production of Hippuric acid in rabits. Am journ. of Phys. Vol. III, Nr. 9, S. 472 (1900). — [60]) Pfeiffer, Th., Bloch, C. und Riecke, R., Eine neue Methode zur Bestimmung der Hippursäure. Mitteilung des landwirtschaftlichen Instituts der Universität Breslau **2**, 273 bis 293, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie üb. 1902, S. 364. — [61]) Pfeiffer, Th. und Eber, W., Beitrag zur Frage über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus. Landwirtschaftliche Versuchsstation **49**, 97 bis 144, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie **27** üb. 1897, S. 722. — [62]) Pfeiffer, Th., Riecke, R. und Bloch, C., Die Muttersubstanzen

der im Organismus der Pflanzenfresser erzeugten Hippursäure. Mitteilung des landwirtschaftlichen Instituts der Universität Breslau **2**, 695 bis 728, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie **33** üb. 1903, S. 865. — [63]) Přibram, E., Zur Lehre von den physiologischen Wirkungen der carbocyclischen Säuren. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **51**, 372 (1904). — [64]) Rem-Picci, G., Über eine neue Methode für die Bestimmung der Hippursäure im Menschenharn. Archiv. di farmac. speriment. **1**, 7, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie üb. 1902, S. 316. — [65]) Riecke, R., Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus. Inaug.-Diss. Breslau 1903, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie **33** üb. 1903, S. 864. — [66]) Rosenberg, Sieg., Über die Beziehungen zwischen Galle und Hippursäurebildung im tierischen Organismus. Centralblatt f. inn. Medizin **22**, 696 bis 698, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie **31**, 707 (1902). — [67]) Salaskin u. Kowalewsky, Das Schicksal des Glykokolls im Organismus des Hundes nach intravenöser Einverleibung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 410. — [68]) Salkowski, E., Das Verhalten des Glykokolls usw. im Organismus. Das. **4**, 100 (1879). — [69]) Salkowski, E., Das. **1**, 1 (1877). — [70]) Salkowski, E., Virchows Archiv **78**, 530 (1879). — [71]) Salkowski, E., Über die Stoffwechselwirkung der Benzoesäure und ihres Anhydrids. Einfluß der Individualität auf dieselbe. Intern. Beiträge zur Medizin (Festschrift für v. Leyden) **2**, 27 (1902). — [72]) Salkowski, E, Über den Einfluß der Verschließung des Darmkanals auf die Bildung der Karbolsäure im Körper. Virchows Archiv **73**, 421 u. 422 (1878). — [73]) Salkowski, E., Zeitschr. f. physiol. Chemie **7**, 168 (1882). — [74]) Salkowski, E., Über das Vorkommen von Allantoin und Hippursäure im Hundeharn. B. B. **11**, 500. — [75]) Salkowski, E., Über das Vorkommen der Phenacetursäure im Harn und die Entstehung der aromatischen Substanzen bei Herbivoren. Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 229 (1885). — [76]) Salkowski, E., Notizen. Das. **4**, 135 (1880). — [77]) Salkowski, E., Bemerkung zur Arbeit von Salomon loc. cit. Das. **3**, 371 (1879). — [78]) Salkowski, E., Das. **12**. — [79]) Salkowski, E., und Salkowski, H., Über das Verhalten der aus dem Eiweiß durch Fäulnis entstehenden aromatischen Säuren im Tierkörper. Das. **7**, 161 (1882 bis 1883). — [80]) Salkowski, E. und Salkowski, H., Über das Verhalten von Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure im Organismus. B. B. **12**, 653. — [81]) Salkowski, E. und Salkowski, H., B. B. **12**, 107. — [82]) Salomon, W., Über den Ort der Hippursäurebildung beim Pflanzenfresser. Zeitschr. f. physiol. Chemie **3**, 365 (1879). — [83]) Schmid, Jul., Über die quantitative Hippursäurebestimmung nach Pfeiffer und über das Schicksal der Chinasäure im Organismus. Centralblatt f. inn. Medizin 1905. — [84]) Schmiedeberg, O., Über Spaltungen und Synthesen im Tierkörper. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **14**, 379 (1881). — [85]) Schotten, Über die Quelle der Hippursäure im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chemie **8**, 60 (1883). — [86]) Schotten, Über die flüchtigen Säuren des Pferdeharnes und das Verhalten der flüchtigen Fettsäuren im Organismus. Das. **7**, 373 (1883). — [87]) v. Schröder, Über die Bildung der Hippursäure im Organismus des Schafes. Das. **3**, 323 (1879). — [88]) Schulze, E. mit Barbieri, J. und Bosshard, E., Untersuchungen über die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweißstoffe durch Salzsäure und durch Barytwasser entstehen. Das. **9**, 63 (1884). — [89]) Guckelberg, Ann. der Chem. u. Pharm. **64**, 39. — [90]) Schultzen, O. und Nencki, M., Die Vorstufen des Harnstoffs im

tierischen Organismus. Zeitschr. f. Biologie 8, 124 bis 146, zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie üb. 1872, S. 296. — 91) Siebert, Kon., Über die nach Benzaldehyd- und Benzoesäure-Darreichung im Harne auftretenden reduzierenden Stoffe. Inaug.-Diss. Königsberg 1901, zitiert nach Jahresbesbericht der Tierchemie üb. 1901. — 92) Soetbeer, Kontrolle der Blumenthalschen Methode der Hippursäurebestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 536 bis 539. — 93) Spiro, Über Nachweis und Vorkommen des Glykokolls. Das. 28, 174 (1899). — 94) Sprengel, Über die chemischen Vorgänge bei der Bildung der Hippursäure. Bern 1875, zitiert nach Hoffmann loc. cit. — 95) Stadelmann, Über die Umwandlung der Chinasäure in Hippursäure im Organismus der Säugetiere. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie 10, 317. — 96) Stolte, Über das Schicksal der Monaminosäuren im Tierkörper nach Einführung in die Blutbahn. Diese Beiträge 5, 15. — 97) Strecker, Vorläufige Notiz über die Spaltung der Cholsäure in Glykokoll und stickstofffreie Säure. Liebigs Ann. 65, 130 (1848) und das. 67, 16. — 98) Umber, Über Abänderung chemischer Eigenart durch partiellen Eiweißabbau im Körper. Berliner klin. Wochenschrift 1903, S. 885. — 99) van de Velde, A. und Stokvis, B. J., Experimentelle Beiträge zur Frage der Hippursäurezersetzung im lebenden Organismus. Archiv f. exper. Pathologie u. Pharmakologie 17, 189. — 100) Virchow, C., Über die Einwirkung des benzoesauren und des salicylsauren Natriums auf den Eiweißumsatz im Körper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 6, 78 (1881). — 101) Voit, Er., Welchen Schwankungen unterliegt das Verhältnis der Organgewichte zum Gesamtgewichte des Tieres? Zeitschr. f. Biologie 46, 153 (1904). — 102) Weyl und Anrep, Über die Ausscheidung der Hippursäure und Benzoesäure während des Fiebers. Zeitschr. f. physiol. Chemie 4, 169 (1880). — 103) Weintraud, Verhandlungen des Kongresses f. inn. Medizin 1900. — 104) Wiener, H., Über das Glykokoll als intermediäres Stoffwechselprodukt. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie 40, 313 (1897). — 105) Wiener, H., Über den Glykokollvorrat des tierischen Organismus. Prager med. Wochenschr. Jahrg. 26, Nr. 50 u. 51. — 106) Wiener, H., Zur Frage des Glykokollvorrats im tierischen Organismus. Das. Jahrg. 27, Nr. 24. — 107) Zimmermann, O., Über künstliche beim Menschen erzeugte Glykokollverarmung und die Abhängigkeit des Glykokollvorrats von der Gallensekretion. Centralblatt f. inn. Medizin 22, 528 bis 533 (1901), zitiert nach Jahresbericht der Tierchemie 31, 702 (1902).

XIV.

Über das Kasein als Säure und seine Unterschiede gegen das durch Lab veränderte Kasein (Parakasein). Theorie der Labwirkung.

Von **Ernst Laqueur**, Heidelberg.

Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.

Die vorliegende Arbeit bildet die Fortsetzung einer früheren Untersuchung, die ich gemeinsam mit O. Sackur*) über die Säurenatur des Kaseins angestellt habe. Wir hatten sein maximales Basenbindungsvermögen bestimmt, ferner die für Phenolphthalein neutralen Kaseinalkalilösungen auf ihre elektrische Leitfähigkeit und innere Reibung untersucht.

Die folgenden Mitteilungen erstrecken sich in ihrem ersten Teile auf diejenigen Kaseinlösungen, in denen das Labferment zu wirken imstande ist; es sind dies die Lösungen der sog. sauren Salze; ich maß ebenfalls ihre elektrische Leitfähigkeit und innere Reibung.

In dem zweiten Teile der Arbeit wird ausgeführt, wie sich die Fällbarkeit durch Ammonsulfat, die Leitfähigkeit und innere Reibung dieser Lösungen nach Einwirkung von Lab ändert.

In dem dritten Teile wird eine Erklärung dieser Veränderungen und damit auch eine Deutung der Labwirkung zu geben versucht.

I.

Die sauren Salze des Kaseins.

Millon und Commaille**), später Hammarsten***), Söldner†) und Courant††) hatten Lösungen von Kasein dargestellt,

---

*) Laqueur und Sackur, Diese Beiträge **3** (1902).

) Millon und Commaille, Compt. rend. **11 (1867).

***) Hammarsten, Malys Jahresber. f. Tierchem. **2**, 118 (1872); das. **4**, 172 (1874); Zeitschr. f. physiol. Chemie **7** (1883).

†) Söldner, Dissertation. Erlangen 1888.

††) Courant, Pflügers Archiv **50**, 109 (1891).

welche auf die gleiche Menge Kasein wechselnde Mengen der Base enthielten.

Die zwei letztgenannten Autoren prüften das Verhalten dieser Lösungen zu verschiedenen Indikatoren. Söldner bezeichnete die für Lackmus neutralen als neutrale, die für Phenolphthalein neutralen, für Lackmus bereits alkalischen, als basisch. Er beobachtete auch, daß die für Lackmus neutralen Lösungen für Methylorange alkalisch reagieren. Courant nennt dagegen diejenigen Lösungen neutral, welche für Phenolphthalein neutral sind und diejenigen sauer, welche weniger Base als diese enthalten. Courant machte weiterhin die Beobachtung, daß nur die für Phenolphthalein sauer reagierenden Kaseinlösungen durch Lab in Parakasein übergeführt werden und bei Gegenwart von löslichen Salzen der Erdalkalien gerinnen.

Er unterscheidet drei Reihen von Salzen je nach der Menge von Base, welche das Kasein bindet. Sein primäres Salz, das nur ein Drittel der Base enthalten soll, die zur Bildung des tertiären, neutralen Salzes nötig ist, kann man nicht nachweisen. Diese Unterscheidung von drei Reihen Salzen hatte für ihn im wesentlichen nur den Wert einer Hypothese, mit deren Hilfe er ein Verständnis des Gerinnungsvorganges anzubahnen suchte; sie ist aber heute in die Literatur als scheinbar sicheres Ergebnis*) aufgenommen.

Indessen ist aus der Tatsache, daß es Lösungen des Kaseins gibt, die für Phenolphthalein sauer sind und überhaupt das oben beschriebene Verhalten gegen Indikatoren zeigen, noch nicht auf die Existenz von sauren Salzen des Kaseins zu schließen. Es könnte sich in diesen Lösungen um Gemische des neutralen Salzes und der Säure handeln.

Die Möglichkeit, daß saure Salze existieren, war gegeben durch die Untersuchungen, welche wir in oben zitierter Arbeit angestellt hatten. Mit Hilfe der Ostwald-Waldenschen Methode hatten wir in dieser gefunden, daß sich das Kasein in seinen für Phenolphthalein neutralen Lösungen wie eine 4- bis 6-basische Säure verhält. Ist nun diese Methode bei einer schwachen Säure wie das Kasein wegen des Einflusses der Hydrolyse auch nicht völlig exakt, so waren die mit ihr erhaltenen Resultate von Wichtigkeit, weil sie bisher die einzige, nicht ohne weiteres anders zu erklärende Hindeutung auf die Existenz saurer Salze enthielten.

Haben wir es nun mit solchen in den für Phenolphthalein sauren Lösungen zu tun, und wie verhalten sich diese?

*) de Jager, Malys Jahresber. f. Tierchem. **27**, 258 (1897).

Die elektrische Leitfähigkeit der für Phenolphthalein sauren Kaseinlösungen.

Zu den Versuchen diente teils das von den Höchster Farbwerken bezogene Kasein, teils ein von mir selbst nach der Hammarstenschen Methode dargestelltes Präparat.

Zur Prüfung der Reinheit der Präparate gebrauchte ich das Basenbindungsvermögen und erhielt Werte, welche im Mittel nur um wenige Prozente von den nach unseren früheren Versuchen berechneten differierten.

Die Bestimmungen wurden nach der bekannten Kohlrauschschen*) Wechselstrommethode im Thermostaten bei 25° ausgeführt. Als Elektroden wurden Tauchelektroden verwandt.

Die zur Untersuchung kommenden konzentriertesten Lösungen wurden durch Auflösen von abgewogenem, lufttrockenem Kasein in kohlensäurefreier Natronlauge hergestellt.

Eine gewisse Schwierigkeit bietet es, Kasein in weniger als in einer zur Neutralität nötigen Menge Lauge aufzulösen. Am besten verfährt man, wenn man Kasein in Wasser fein verteilt und dann unter fortwährendem Schütteln allmählich Lauge hinzusetzt; oft war zum Verschwinden kleinster Kaseinteile vierundzwanzigstündiges Stehen notwendig. Die verdünnten Lösungen wurden durch Verdünnen der konzentrierten Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser im Leitfähigkeitsgefäße selbst hergestellt.

Die Übereinstimmung der einzelnen Versuchsreihen war keine sehr gute, und zwar liegt dies an der Schwierigkeit, den Widerstand der Lösungen genau zu bestimmen. Es ist nämlich auffallend, wie schnell sich dieser im Gefäße auch während kurzer Zeit ändert. Wiederholt man nun aber die Ablesungen häufiger, um aus ihnen das Mittel zu finden, so läßt sich auch bei kurzem Stromschluß nur schwer geringes Ausfallen von Eiweiß an den Elektroden vermeiden; abgesehen von der Konzentrationsänderung, die wohl nicht wesentlich ist, ändert sich die Kapazität bedeutend, und so wird dann eine genaue Bestimmung unmöglich. Ferner müssen noch andere unbekannte Ursachen mitwirken, die den Widerstand ändern, denn er bleibt auch ohne sichtbare Fällung nicht konstant. Man darf hier wohl an analoge Erfahrungen bei andern Kolloiden denken, die ohne erkennbare äußere Ursache irreversible Zustandsänderungen zeigen, eine Eigenschaft, die van Bemmelen mit dem Namen Hysteresis belegte. Namentlich wird diese Eigenschaft bei etwas größeren Zeiträumen, von 24 und 48 Stunden, deutlich, wo Unterschiede in der Leitfähigkeit bis 11 Proz. nichts Ungewöhnliches sind, die meist in der Richtung liegen, daß die Leitfähigkeit der frischen Lösung eine bessere ist. Etwaige Fäulnis dafür verantwortlich zu machen,

*) Kohlrausch und Holborn, Leitvermögen der Elektrolyte. Leipzig 1898.

ist wohl nicht angängig, da die Lösungen bei 0° bis 4° im verschlossenen Gefäße aufbewahrt wurden und sich auch nach 6tägigem Stehen bei dieser Temperatur nur zuweilen durch einen geringen Bodensatz von frisch bereiteten unterschieden, besonders auch keinen auf Fäulnis hindeutenden Geruch zeigten. Die Unzulänglichkeiten bei der Leitfähigkeitsmethode konnten nur durch die Zahl der Versuche ausgeglichen werden. Da ich diese aber sehr groß werden ließ, darf die Kurve der Äquivalentleitfähigkeiten, die sich dann durch graphische Interpolation ergab, den Anspruch machen, in befriedigender Annäherung die tatsächlichen Verhältnisse wiederzugeben.

Die konzentriertesten Lösungen enthielten aus später zu erörternden Gründen zu einem großen Teile auf 20 ccm 2 Tropfen (= 0,08 ccm) gekochte Lablösung. Der dadurch entstehende Fehler konnte vernachlässigt werden, da er kleiner war als die Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchsreihen.

Die Tabelle I enthält zum Vergleich die Leitfähigkeit der neutralen Salze.

In der ersten Spalte steht der Prozentgehalt an Kasein; in der zweiten die Verdünnung v in Äquivalenten des Natriums; in der dritten die spezifische Leitfähigkeit $\varkappa$ in reziproken Ohm; die vierte enthält das Äquivalentleitvermögen $\Lambda = \varkappa . 1000$ v., die Zahlen in den Klammern daneben sind die Ergebnisse aus der früheren Arbeit.*)

Tabelle I.

Leitfähigkeit der für Phenolphthalein neutralen Kaseinlösungen.

% Kasein	v	$\varkappa$ (25°)	Λ
2,78	40	$11,25 . 10^{-4}$	45,0 (46,5)
1,39	80	6,12 „	49,0 (51,3)
0,695	160	3,40 „	54,5 (56,2)
0,3475	320	1,87 „	60,0 (63,0)
0,1737	640	1,04 „	66,5 (69,5)

Die Zahlen zeigen Abweichungen gegen die in der früheren Arbeit gewonnenen; es liegt dies wohl an den schon oben erwähnten Schwierigkeiten der Methodik. Der Gang der Kurve ist übrigens ganz der gleiche und die relative Abnahme

$$\frac{\Lambda_{640} - \Lambda_{40}}{\Lambda_{640}} = \frac{66,5 - 45}{66,5} = 0,324$$

statt 0,331.

Die sauren Lösungen, deren Leitfähigkeit in Tabelle II folgt, enthielten 47 bis 56 Proz. der zur Neutralität nötigen Menge Natronlauge.

*) Laqueur und Sackur, loc. cit. S. 199.

Tabelle II.
Leitfähigkeit der für Phenolphthalein sauren Kaseinlösungen.

% Kasein	v	$\varkappa$	Λ
3,56	62,5	$7{,}92 \cdot 10^{-4}$	49,5
2,78	80	6,5 „	52,0
1,39	160	3,53 „	56,5
0,695	320	1,95 „	62,5
0,3475	640	1,08 „	69,0

Die erste Zeile enthält schon eine verdünntere Lösung, weil das Arbeiten mit noch konzentrierteren zu schwierig ist.

Das Auffallende im Vergleich von Tabelle I mit Tabelle II ist die Übereinstimmung im Gange der Kurve, und mehr noch die Übereinstimmung der einzelnen Werte bei gleicher Natriumkonzentration. Mit den früher gewonnenen Zahlen der neutralen Salze herrscht fast völlige Identität. Die Leitfähigkeit der sauren Salze macht den Eindruck, als ob für deren Größe nur das Natrium in Betracht käme, gleichgültig mit wieviel Kasein es verbunden ist.

Dies zeigt auch deutlich Tabelle III, wo durch fortschreitenden Laugenzusatz die sauren Lösungen allmählich den neutralen genähert werden, und wir ferner sehen, daß es bei Berechnung der Leitfähigkeitskurve der Tabelle II gleichgültig war, ob wir Salze untersuchten, die nur 46,8 oder 56 Proz. des zur Neutralisation des Kaseins erforderlichen Alkalis enthielten.

Tabelle III.

% Kasein	% Azidität	v	$\varkappa$	Λ
1,99	46,3	119,0	$4{,}45 \cdot 10^{-4}$	52,9
	58,0	96,1	5,44 „	52,3
	69,0	80,6	6,45 „	52,0
	91,4	61,0	7,90 „	48,2

Die Abnahme der Äquivalentleitfähigkeiten entspricht der Abnahme der Verdünnung.

Eine Entscheidung der Frage, ob nun Kasein saure Salze bilde, erhalten wir darum durch die Leitfähigkeitsmessungen in den sauren Lösungen nicht; denn die nähere theoretische Betrachtung lehrt uns, daß das obige Resultat, die Übereinstimmung der Leitfähigkeitskurve der neutralen und sauren Kaseinlösungen, erklärt wird sowohl, wenn man die Existenz saurer Salze annimmt, als, wenn man sie leugnet.

Fassen wir zunächst diesen letzteren Fall ins Auge: Kasein bilde keine sauren Salze, dann hätten wir, wie schon oben erwähnt, in den sauren Lösungen ein Gemisch der Säure H Kas (Kasein) mit dem neutralen Salz Na Kas. Von der Säure, dem Kasein, wissen wir nun aus unsern früheren Untersuchungen, daß sie unlöslich ist, folglich wird sie auch in diesen Lösungen nicht im osmotischen Sinne gelöst, sondern nur kolloidal, gleichsam in Suspension, enthalten sein. Dies beweist auch das sehr trübe Aussehen der Lösungen.

Die Unlöslichkeit des Kaseins ist aber bisher nur in reinem Wasser*) nachgewiesen; es ist immerhin noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß es in dem Kaseinsalz enthaltenden Medium zum Teil wenigstens löslich ist.

Aber auch in diesem Falle käme der lösliche Teil für die Leitfähigkeit nicht in Betracht, denn er könnte nur minimal dissoziiert sein. Es handelte sich nämlich dann um die Mischung eines schwachen Elektrolyten (Säure H Kas) mit einem starken gleichionigen Salz (Na Kas), und wir wissen, daß dadurch die ohnehin geringe Dissoziation des schwachen Elektrolyten noch zurückgedrängt wird, mithin ist der Anteil der Säure an der Leitfähigkeit des Gemisches zu vernachlässigen**). Dadurch wäre die Übereinstimmung der Leitfähigkeit der neutralen und sauren Lösungen, bezogen auf die gleiche Verdünnung des Natriums, genügend erklärt.

Untersuchen wir den andern, wahrscheinlicheren, Fall, das Kasein bilde saure Salze, so befinden sich, unter Annahme der Sechswertigkeit bei Zufügung von nur 50 Proz. der zur Neutralität nötigen Natronlauge, in der Lösung alle möglichen Kombinationen der dissoziierten und undissoziierten Molekelformen $Kas H_6$ und 3 Na OH. Die dissoziierten Formen $Kas H_5'$, $Kas H_4''$ usw. $H^{\cdot}$, $Na^{\cdot}$, OH' werden im Gleichgewicht sein mit den undissoziierten $Kas H_6$, $Kas H_5$ usw. Dieses Gleichgewicht wird, jemehr Natronlauge und mit ihr OH' zugefügt werden, durch Bildung von Kas-Ionen verschoben und zwar jemehr OH', um so weniger H-Atome enthalten die Kas-Anionen, die sich der Form Kas'''''' zu nähern suchen. In den neutralen Salzen ist dieser Endzustand keineswegs erreicht. Denn die geringe Ionenbildungstendenz läßt, wie wir früher gezeigt haben, immer wieder $Kas H_6$ entstehen (Opaleszenz der Lösung, alkalische Reaktion auf Lackmus),

*) Laqueur und Sackur, loc. cit. S. 196. Osborne, Journ. of Physiol. **27**, 398 (1901).

**) Abegg, Dissoziationstheorie (Ahrens' Vortragssammlung) 1903.

die Zwischenstufen KasH_5', KasH_4'' usw. sind also immer noch in höherem Maße vorhanden als das Ion Kas$''''''$. Überlegen wir nun weiter, daß die Leitfähigkeit des Salzes überhaupt nur zum kleinsten Teile auf Kosten der Kaseinionen zu setzen ist, da das meiste dabei die viel schneller beweglichen Natriumionen, und bei großer Verdünnung die durch die Hydrolyse auftretenden sehr beweglichen Hydroxylionen leisten, und bedenken wir ferner, daß je komplizierter die Anionen sind, desto bedeutungsloser für ihre Beweglichkeit die Vermehrung um einzelne Atome, also hier H-Atome ist, so wird verständlich, daß die Leitfähigkeit nicht anders wird, ob die vorhandene negative Elektrizitätsmenge sich beispielsweise auf 6 KasH_5' oder 3 KasH_4'' usw. verteilt. Die Konzentration der Natriumionen wird hier die Größe der Leitfähigkeit wesentlich bestimmen.

Die innere Reibung der für Phenolphthalein sauren Kaseinlösungen.

Die Messung der inneren Reibung dagegen zeigte, daß es sich in den sauren Lösungen wohl nicht um ein Gemisch von gleichen Teilen ungespaltene Säure und Neutralsalz handeln kann, sondern, daß die zuletzt besprochene Auffassung, die Annahme saurer Ionen, zu Recht bestehe.

Wenn t die Zeit bedeutet, welche reines Wasser durch die Kapillare fließt, T die Ausflußzeit desselben Volumens der zu messenden Lösung, s das spezifische Gewicht des Wassers, S das der Lösung, so ist die innere Reibung bezogen auf Wasser als Einheit

$$\eta = \frac{S \,.\, T}{s \,.\, t}.$$

Arrhenius*) hat nun weiter gezeigt, daß die Beziehung gilt: $\eta = A^n$ oder $\frac{\log \eta}{n} = \log A$, wo A eine von der Natur des gelösten Stoffes abhängige Konstante ist und n die Normalität der Lösung bedeutet. Wir hatten in der früheren Arbeit bei neutralen Salzen diese Beziehung bestätigt gefunden, und zwar schwankend von 14,8 bis 14,3 bei Lösungen, die 2,0 bis 0,5 Proz. Kasein enthielten. Ich wiederholte zunächst diese Messungen an neutralen Salzen des Kaseins in größerem Umfange, um entgegen neueren Behauptungen**) von der sehr beschränkten Giltigkeit der Arrheniusschen Formel neues Material zu ihrer Bestätigung herbeizuschaffen.

---

*) Arrhenius, Zeitschr. f. physikal. Chemie **1** (1887).

) Rudorf, Das. **43 (1903).

Die innere Reibung wurde nach der von Arrhenius (loc. cit.) beschriebenen Poiseuille-Ostwaldschen Methode durch Messung der Ausflußgeschwindigkeit aus einer Kapillare bei 25° gemessen. Die Temperatur wurde auf 0,1° genau gehalten, die senkrechte Stellung des Ausflußrohres durch eine Einrichtung garantiert, die der im Ostwaldschen Institute gebräuchlichen nachgebildet war.

Die spezifischen Gewichte der konzentriertesten Lösungen wurden mit dem Pyknometer bestimmt, sie betrugen gewöhnlich 1,01 bis 1,008, die der verdünnteren wurden durch Interpolation berechnet.

In Tabelle IV steht in der ersten Spalte Prozentgehalt an Kasein, in der zweiten Normalität an Natronlauge, in der dritten η die auf Wasser bezogene innere Reibung, in der vierten $\log A = \frac{\log \eta}{n}$, in der fünften eine andere Konstante $\log B = \log \eta$ dividiert durch den Prozentgehalt an Kasein.

Tabelle IV.
Innere Reibung der für Phenolphthalein neutralen Kaseinlösungen.

% Kasein	n	η (25°)	log A	log B . 10^2
3,024	0,0276	2,46	14,2	12,9
1,512	0,0138	1,56	14,0	12,7
0,756	0,0069	1,257	14,4	13,1
0,378	0,00345	1,128	15,2	13,8
1,345	0,0122	1,49	14,2	12,9
0,6725	0,0061	1,22	14,1	12,8
2,96	0,02622	2,48	15,0	13,3
1,48	0,01311	1,54	14,3	12,7

Die Übereinstimmung der Konstanten und zwar sowohl für log A wie log B ist eine befriedigende.

Versuche, η als eine lineare Funktion*) darzustellen wie z. B. $\eta = 1 + a . n$, wo a die etwaige Konstante, n die Normalität der Lösung bedeutet, mißlangen vollkommen, etwas besser, wenn auch nur in engen Grenzen, genügte eine quadratische Gleichung $\eta^2 = a . n$.

In der Tabelle V folgen die Ergebnisse über die innere Reibung der sauren Salze und zwar zunächst der inneren Reibung von Lösungen, welche etwa 50 Proz. der zur Neutralisation erforderlichen Base enthalten.

Die Bezeichnungen sind dieselben wie in Tabelle IV, nur ist in der dritten Spalte angegeben, wieviel Proz. der zur Neutralität nötigen Lauge die Lösung enthält.

*) Rudorf, loc. cit.

Tabelle V.

Innere Reibung der für Phenolphthalein sauren Kaseinlösungen.

% Kasein	n	% Azidität	η	log A	log B . 10^2
1,501	0,00691	51,0	1,54	26,9	12,4
3,24	0,0153	52,5	2,44	25,4	12,0
3,70	0,01865	55,5	2,88	24,6	12,4
1,85	0,009325	"	1,71	25,0	12,6
3,78	0,01904	"	2,89	24,2	12,2
1,89	0,00952	"	1,68	23,7	11,9
0,945	0,00476	"	1,27	21,8	11,0

Weiterhin zeigt Tabelle VI die Zunahme der inneren Reibung der sauren Kaseinlösungen bei Erhöhung der relativen Azidität in allmählicher Annäherung an die neutralen Lösungen.

Für sie gelten die obigen Bezeichnungen; sie enthält einen von mehreren Versuchen mit gleichem Resultat.

Tabelle VI.

% Kasein	n	% Azidität	η	log A	log B . 10^3
3,24	0,0153	52,5	2,44	25,4	11,98
	0,0193	66,2	2,46	20,2	12,05
	0,0233	80,0	2,52	17,25	12,4
	0,0273	93,6	2,65	15,5	13,5

Bei der ersten Betrachtung fällt auf, daß log A sowohl auf Tabelle V wie VI nicht konstant ist, gegenüber der ziemlichen Konstanz des log B. Es liegt aber hierin, wie wir im folgenden zeigen werden, der Beweis, daß das Kasein auch in den sauren Lösungen zum größten Teile als Ion enthalten ist. Die innere Reibung einer Elektrolytenlösung ist zusammengesetzt aus der Reibung der Ionen und der des undissoziierten Bestandteiles also $\eta = S^x . A^y . K^y$, wo S die Reibungskonstante des undissoziierten Anteiles, x seine Konzentration, A, K die Reibungskonstanten des Anions und Kations, y deren Konzentration bedeutet*); bei schwachen Elektrolyten käme noch als vierter Faktor die durch die Hydrolyse entstandene nicht dissoziierte Säure bzw. Base hinzu, F^z, wo F diesen hydrolytisch abgespaltenen Teil, z seine Konzentration darstellen soll. Nun dürfen wir die hohe innere Reibung von Kaseinsalzen hauptsächlich auf Rechnung der Kaseinanionen setzen und K^y gegen A^y vernachlässigen, ferner wird x, die Konzentration an ungespaltenem Kaseinsalz bei den relativ verdünnten Lösungen,

*) Euler, Zeitschr. f. physikal. Chemie **25**.

die wir nur untersuchen können, gering sein; der letzte Faktor endlich F^z wird für die innere Reibung hier auch nicht unmittelbar in Betracht kommen, da das durch Hydrolyse entstandene, nicht dissoziierte Kasein F zum größten Teil unlöslich, nur in Suspension enthalten ist; solche kleine suspendierte Teilchen haben aber bekanntlich darum keinen Einfluß auf die innere Reibung, da sie sie sich ebenso wie die Wände des Kapillarrohres mit einer Flüssigkeitsschicht überziehen, und so immer nur Teile der Flüssigkeit gegeneinander reiben. Wir können also, namentlich im Hinblick auf einige sogleich zu beschreibende Versuche, daran festhalten, daß hauptsächlich die Kaseinionen die innere Reibung bewirken*).

Beständen nun, wie wir bei Besprechung der Leitfähigkeit als ersten möglichen Fall annahmen, die sauren Lösungen, die etwa 50 Proz. der zur Neutralität nötigen Menge Lauge enthalten, aus einem Gemisch von gleichen Teilen Neutralsalz und Säure, so müßte die Konstante der inneren Reibung, bezogen auf Äquivalente Natrium in den neutralen und sauren Lösungen ungefähr dieselbe sein, bezogen aber auf den Kaseingehalt in den sauren Lösungen etwa nur die Hälfte betragen. Denn der Einfluß der Säure auf die innere Reibung ist, wie schon erwähnt, gering, da sie entweder ganz ungelöst, jedenfalls aber so gut wie nicht ionisiert ist, und spätere Versuche noch näher zeigen werden, daß die Ionen hauptsächlich die Ursache der hohen inneren Reibung unserer Lösungen sind.

Nun finden wir aber die Konstante $\log A = \frac{\log \eta}{n}$, wo n die Normalität an Natrium bedeutet, in den sauren Salzen doppelt so groß, die Konstante $\log B = \frac{\log \eta}{\text{Proz. Kaseingehalt}}$ aber annähernd gleich wie in den neutralen Lösungen. Daraus geht hervor, daß jedes Kaseinmolekül in beiden Fällen den gleichen Einfluß auf die innere Reibung hat; dies kann es aber nur, wenn es auch in den sauren Lösungen als Ion enthalten ist. Ihr Unterschied gegenüber den neutralen besteht dann, wie schon erwähnt darin, daß die herrschenden Ionengleichgewichte nach der Richtung verschoben sind, daß mehr Ionen existieren, die noch mehrere H-Atome besitzen. Da der Einfluß einzelner H-Atome auf die Ionenbeweglichkeit und somit Reibungsgröße sehr gering ist, so wird verständlich, wenn wir jetzt zusammen-

*) Laqueur und Sackur, loc. cit.

fassend sagen: in Lösungen von gleichem Prozentgehalt an Kasein wird die innere Reibung annähernd dieselbe sein, wenn die Konzentration an Kaseinionen die gleiche ist, unabhängig von ihrer Art.

Die Konstante B ist jedoch nicht völlig gleich in den sauren und den neutralen Lösungen; dies ist bedingt durch die Hydrolyse.

Das hierdurch entstandene Kasein hat zwar als solches keinen unmittelbaren Einfluß auf die innere Reibung, wohl aber einen mittelbaren dadurch, daß bei seiner Bildung Kaseinionen, das ist reibungstüchtiges Material, verschwinden. Da nun in den sauren Lösungen die Hydrolyse stärker als in den neutralen ist, so finden wir, daß die innere Reibung der sauren Lösungen etwas niedriger ist.

Verringert man die Hydrolyse durch Zusatz von OH', so wird die innere Reibung eine höhere; dies ist ebenso der Fall, wenn wir die sauren Salze durch Laugenzusatz allmählich in die neutralen überführen (Tabelle VI), als wenn wir, wie in früheren Versuchen*), zu den neutralen Lösungen noch überschüssige Lauge hinzufügen.

In letzterem Falle nimmt die innere Reibung noch zu, um von einem Maximum wieder abzunehmen. Wir erklärten dies früher (loc. cit.) damit, daß zunächst die Hydrolyse immer weiter zurückgedrängt werde und mehr Kasein im Ionenzustande existiere, daß sich aber allmählich der Einfluß des zugesetzten Na˙ geltend mache. Es besteht nämlich zwischen Kasein- und Natriumionen das Gleichgewicht:

$$\frac{Na^{\cdot} . Kas'}{Na\ Kas} = k.$$

Werden nun die Natriumionen vermehrt, so bildet sich mehr elektrisch neutrales Kaseinnatrium, es verschwinden also Kaseinionen. Die innere Reibung wird somit dann abnehmen, wenn durch den Natronlaugenzusatz mehr Kaseinionen verschwinden, als durch Zurückdrängen der Hydrolyse gebildet werden.

Zum Beweise dieser Anschauung stellten wir schon früher Versuche an, in denen wir zu neutralen Kaseinsalzen Kochsalz hinzufügten; die innere Reibung nahm ab. Eine Wiederholung dieser Versuche bei sauren Salzen gab das gleiche Resultat. Die innere Reibung ging zurück. Tabelle VII enthält diese Versuche.

Die Bezeichnungen sind die gleichen wie früher, in der letzten Reihe ist angegeben, welches Volumen der Lösung durch den

---

*) Laqueur und Sackur, loc. cit.

Reibungsapparat hindurchging, um die Größe der Verdünnung durch die Zusätze zu zeigen.

Tabelle VII.

% Kasein	n	% Azidität	Normalität an NaCl	η	Volumen
3,70	0,01865	55,5	—	2,89	10,00
			0,004	2,74	10,04
1,85	0,00932	„	—	1,71	10,00
			0,004	1,615	10,04
			0,008	1,58	10,08
			0,012	1,56	10,12
			0,016	1,53	10,16
			0,02	1,48	10,20

Im Gegensatz zum Einflusse dieses gleichionigen Elektrolyten hatte KCl gar keinen Einfluß auf die innere Reibung außer denselben wie Wasser, d. i. eine viel geringere Herabsetzung der innern Reibung entsprechend der Verdünnung. Deren Wirkung ist überhaupt immer in Rechnung zu ziehen. Daher darf man auch nicht mit zu gering konzentrierten Zusätzen arbeiten, dann ist nämlich entweder überhaupt kein oder nur der Einfluß der Verdünnung zu konstatieren.

Einen Beleg gibt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

% Kasein	n	% Azidität	Normalität an zugesetzter Lauge	η	Volumen
2,82	0,01372	54,0	—	2,14	10,00
			0,0004	2,14	10,04
			0,0012	2,12	10,12
			0,002	2,12	10,20
			0,0028	2,105	10,28
			Zusatz von Wasser in ccm		
			0,08	2,096	10,36
			0,16	2,085	10,44

Daß bei Kochsalzzusatz nicht nur die Verdünnung sondern ein spezifischer Einfluß auf die innere Reibung vorliegt, ergibt ein Vergleich der Zahlen von Tabelle VII mit denen von Tabelle VIII. Bei einer Zunahme des Volumens um 0,16 ccm von 10,28 bis 10,44 durch Zufügung von Wasser nimmt die innere Reibung um 1 Proz.

ab (Tab. VIII), bei der von 10,00 bis 10,16 durch Zufügung von $\frac{n}{1}$-NaCl-Lösung um 10,5 Proz. (Tab. VII).

Wir dürfen also als festgestellt ansehen, daß in einer Lösung von Kaseinnatrium durch Vermehrung von Natriumionen, die keinen Einfluß auf die Hydrolyse haben, die Kaseinionen zurückgedrängt werden.

Trotzdem ist das Zurückgehen der innern Reibung bei stärkerem Natronlaugenzusatz d. h. einem Zusatz über Neutralität, nicht allein durch den Einfluß der Natriumionen auf das elektrolytische Gleichgewicht bedingt; ich fand nämlich, daß Kalilauge die gleiche Wirkung hat: erst Zunahme der inneren Reibung, bei einer bestimmten OH'-Konzentration Erreichen eines Maximums, dann Abnahme. Tabelle IX zeigt dies Verhalten.

Tabelle IX.

% Kasein	n	% Azidität	Normalität des zugesetzten NaOH	η	Volumen
1,635	0,00825	56,2	—	1,535	10,04
abnehmend bis	0,01225	83,3	0,004	1,55	10,08
	0,02025	138	0,012	1,58	10,16
	0,02825	192	0,020	1,78	10,24
	0,03225	**219**	0,024	**1,81**	10,28
	0,04025	274	0,032	1,70	10,36
1,57	0,04825	328	0,040	1,66	10,44
			Normalität der zugesetzten KOH		
1,501	0,0073	54,0	—	1,52	10,04
abnehmend bis	0,0117	83,7	0,0044	1,53	10,08
	0,0197	143	0,0124	1,59	10,16
	0,0277	**202**	0,0204	**1,78**	10,24
	0,0357	262	0,0284	1,75	10,32
1,44	0,0437	320	0,0364	1,69	10,40

Die Erklärung für die Zunahme der inneren Reibung beim Hinzufügen von OH' durch Zurückgehen der Hydrolyse ist wohl richtig, die Abnahme bei stärkerer OH'-Konzentration aber auf einen spaltenden Einfluß zu beziehen. Wir wissen ja, daß die

Eiweiße gegen irgend welche stärkere Konzentrationen von Alkalien sehr empfindlich sind. Die Unabhängigkeit dieser Erscheinungen vom Kation macht es wahrscheinlich, daß wir eine OH'-Wirkung darin sehen müssen.

Fassen wir nun die Ergebnisse über die sauren Salze zusammen, so können wir sagen, daß zwischen ihnen und den neutralen Salzen kein wesentlicher Unterschied besteht, es stellen vielmehr alle Kaseinsalze ein Gemisch von Kaseinionen (mit verschiedenem elektrolytisch abspaltbarem H-gehalt) und ungespaltenem (durch Hydrolyse entstandenem) Kasein dar. Hervorzuheben ist dabei, daß die Konzentration an letzterem in den sauren Lösungen verhältnismäßig größer ist.

Wir finden bei allmählichem Laugenzusatz zu Kasein keine scharf ausgezeichneten Punkte, darum ist es besser, die Bezeichnungen Mono-, Di-, Tri-Kaseine fallen zu lassen.*) Besonders ist ein sekundäres Salz mit Eigenschaften, die es allein befähigen sollen, durch Lab verändert zu werden, nicht nachzuweisen.

II.

Unterschiede zwischen Kasein und Parakasein.

Nachdem wir so im vorhergehenden mit den physikalisch-chemischen Methoden etwas näher die Natur der Lösungen des Kaseins kennen gelernt, vor allem auch die der sog. sauren Salze, die allein für Lab angreifbar sind, durfte ich versuchen festzustellen, ob nicht mit Hilfe dieser Methoden auch Unterschiede zwischen Lösungen des Kaseins und solchen, auf die Lab gewirkt hatte, Parakaseinlösungen, zu gewinnen wären.

Nach den Untersuchungen Hammarstens**) wurde der Gerinnungsprozeß von der Mehrzahl der Forscher für zweiphasig angesehen: d. h. Einwirkung des Ferments auf das Kasein und seine Umwandlung in Parakasein als erste Phase, Ausfällung, die sichtbare Gerinnung als zweite; nur für letztere sei die Gegenwart von löslichen Kalksalzen notwendig. Hammarsten schloß dies aus folgendem grundlegenden Versuche: wurde Kasein in Natriumphosphat gelöst und Lab hinzugefügt, so trat bei nachträglichem Zusatz einer solchen Menge Chlorcalcium Fällung ein, die vorher zur Ausfällung nicht genügt hatte. Courant vereinfachte diesen Versuch, indem er das

---

*) Auch Raudnitz (Ergebnisse d. Physiol. **2**, 1) wendet sich auf Grund unserer früheren Versuche (loc. cit.) gegen diese Namen.

) Hammarsten, Malys Jahresber. f. Tierchem. **4 (1874).

Kasein anstatt in phosphorsaurem Salze in einer zur Neutralität ungenügenden Menge Natronlauge oder Calciumhydroxyd auflöste.

Gegen diese Versuche läßt sich einwenden, daß die Zweiphasigkeit der Gerinnung durch sie nicht bewiesen werde, da es nicht ausgeschlossen sei, daß das Lab erst im Augenblicke des Zusatzes der Calciumionen wirke. Dieser Einwand konnte aber widerlegt werden, da die Gerinnung auch eintrat, wenn die Lösung nach dem Labzusatze gekocht, und das Ferment hierdurch zerstört wurde. Trotzdem wurde immer wieder der Einfluß des Labs und des Chlorcalciums zusammengeworfen und von Autoren wie Duclaux*) sogar identifiziert. Andere Forscher machten sich eine für unsern heutigen ionentheoretischen Standpunkt nicht ganz verständliche Vorstellung von der Beziehung, welche zwischen dem Labferment, dem Kasein und den Kalksalzen besteht; so soll nach de Jager**) das Lab dem Kasein Calcium zuführen.

Die Schwierigkeit, diese Beziehungen richtig zu deuten, liegt daran, daß sich bisher die Veränderungen, welche das Kasein in einer kalkfreien Lösung durch das Labferment erfahren hat, ohne Mithilfe von Calcium bzw. anderer Erdalkalien nur schwer haben nachweisen lassen.

Die Unterschiede in der elementaren Zusammensetzung des Kaseins und Parakaseins sind geringe und unsichere. Hammarsten (loc. cit.) und Köster***) und in neuerer Zeit Rotondi†) behaupteten, Parakasein enthalte weniger Stickstoff und Phosphor als Kasein, Raudnitz††) stellte demgegenüber ungefähr gleichen Stickstoff- und Phosphorgehalt fest und Duclaux*) leugnete ebenfalls, daß die durch Porzellan filtrierbare Menge Stickstoff nach der Gerinnung steige. Eine aus hiesigem Institut demnächst zu veröffentlichende Arbeit soll Genaueres darüber angeben.

Die „Ungerinnbarkeit" des Parakaseins.

Als einer der wichtigsten Unterschiede zwischen Kasein und Parakasein wird stets angegeben: Parakaseinlösungen seien für Lab ungerinnbar. In dieser Behauptung liegt ein innerer Widerspruch: versteht man unter Gerinnung nach den Hammarstenschen Versuchen (loc. cit.) korrekterweise Umwandlung des Kaseins

---

*) Duclaux, Traité de Microbiologie. Tome 2. Paris 1899.
**) de Jager, loc. cit.
***) Köster, Malys Jahresber. f. Tierchem. 11, 14 (1881).
†) Rotondi, Monatsschrift f. Kinderheilkunde 1 (1903).
††) Raudnitz, Das. 2 (1904).

in Parakasein und dessen Fällung durch lösliche Kalksalze, so kann natürlich einmal umgewandeltes Kasein nicht nochmals umgewandelt werden, wohl aber muß es in Lösungen, die zu seiner Fällung genügende Mengen Chlorcalcium enthalten, ausfallen. Hammarstens Versuche*), die die Ungerinnbarkeit von Kaseinlösungen erweisen sollten, im Gegensatz zu der Petersschen**) Behauptung, sind nur ein Beweis, daß Parakasein bei Zusatz von salzfreiem Lab und einer gewissen Menge Chlorcalcium in Lösung bleibt; bei derselben Menge würde aber auch bei Einwirkung des Labs auf eine Kaseinlösung keine sichtbare Veränderung vor sich gehen.

Trotzdem behalten die Hammarstenschen Versuche ihren Wert zur Widerlegung der Petersschen Angabe, daß Lab in einer Parakaseinkalklösung ohne Anwesenheit von Chlorcalcium allein eine Fällung, d. h. Gerinnung bewirke. Ich selbst konnte durch mehrfache Versuche bestätigen, daß eine solche, und zwar eine geringfügige unvollständige Fällung nur eintritt, wenn das Lab kochsalzhaltig war, und daß die Lösung sich ganz gleich verhielt, ob gekochtes oder ungekochtes Lab verwandt wurde. Man darf daher garnicht von Gerinnung solcher Parakaseinlösungen sprechen, sondern nur von Ausfällung, sowohl durch Chlorcalcium wie geringe Mengen Chlornatriums. In dem Verhalten zu dem letzteren ist in diesen Versuchen ein Unterschied zwischen Kasein- und Parakaseinlösungen nicht zu erkennen. Sie scheinen mir die oben erwähnte Angabe zu widerlegen, daß Lab und Kalksalze dieselbe Wirkung auf Kasein haben, nämlich dies zu fällen; vermutlich führte nur die Verwendung salzhaltiger Präparate zu dieser Anschauung.

Die Fällungsgrenzen des Parakaseins (und Kaseins).

Die Parakaseinlösungen lassen sich von den Kaseinlösungen bekanntlich dadurch unterscheiden, daß sie durch geringere Mengen von Chlorcalcium gefällt werden.

In letzter Zeit zeigte Loevenhart***), daß auch andere Salze Parakasein leichter und bei niedrigerer Temperatur als Kasein ausfällen. Ich bestimmte nun, um die Unterschiede durch Zahlen ausdrücken zu können, die Fällungsgrenzen von Kasein- und Parakaseinlösungen nach der bekannten Hofmeisterschen Methode mit Ammonsulfat. Diese wie alle weiter unten stehenden Ver-

*) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chemie **22**, 103 (1896).
**) Peters, Dissertation und Preisschrift. Rostock 1894.
***) Loevenhart, Zeitschr. f. physiol. Chemie **41**, 178.

suche bestanden aus zwei Teilen, von denen der erste den Kontrollversuch darstellte, indem zur Lösung gekochtes Lab zugefügt wurde, der zweite den eigentlichen Versuch mit Parakasein, d. h. der Kaseinlösung, welche der Einwirkung des Labferments unterworfen worden war.

Die Lablösung stellte ich selbst dar, Kälbermagen wurde mit 0,4 bis 0,5 proz. Salzsäure 48 Stunden unter Zusatz von Thymol extrahiert, das Extrakt abgegossen, gegen öfter gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert, und der Niederschlag abfiltriert. Die Lösung enthielt nur wenig Eiweiß und ihre Azidität für Phenolphthalein entsprach etwa der einer $^{n}/_{20}$-Säure.

Um 30 ccm einer 3 proz. Kaseinlösung innerhalb weniger Minuten zur Gerinnung zu bringen, genügte bei Zusatz des gleichen Volumens 0,4 proz. neutraler Chlorcalciumlösung 1 Tropfen = 0,04 ccm meiner Lablösung.

Gewöhnlich wurde auf 10 ccm Kaseinlösung ein Tropfen Lab bzw. gekochtes Lab zugefügt; beide Lösungen blieben dann etwa eine halbe Stunde zwischen 38 bis 40° C im Wasserbade. Zu einzelnen Proben der Lösungen wurden gleiche Volumina 0,4 proz. Chlorcalciums gefügt, und es wurde aus dem Eintreten bzw. Ausbleiben des Niederschlages auf die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit der Lab- bzw. gekochten Labzusätze geschlossen.

In der Tabelle X steht in der ersten Spalte Prozentgehalt an Kasein bzw. Parakasein, in der zweiten, wieviel der zur Neutralität nötigen Lauge angewandt wurde, in der dritten die untere Fällungsgrenze, d. i. die Zahl Kubikzentimeter gesättigter Ammonsulfatlösung, bei der die Fällung beginnt, in der vierten die obere Fällungsgrenze, bei der die Fällung vollendet scheint, d. h. das klare Filtrat auch bei weiterem Ammonsulfatzusatz klar bleibt, aber noch Eiweißreaktion zeigt, in der fünften endlich die von mir sogenannte oberste Grenze, wo das klare Filtrat auch keine Eiweißreaktion mehr gibt. Die oberen Zahlen bedeuten Kasein, die unteren Parakasein.

Tabelle X.

% Kasein bzw. Parakasein	% Azidität	Fällungsgrenze		
		untere	obere	oberste
4,12	55	2,4 2,2	3,4 2,6	3,8 3,4

Wir sehen, daß das Parakasein zeitiger zu fallen beginnt und auch eher die obere Fällungsgrenze erreicht.

Daß durch den Labzusatz in der Kaseinlösung eine Veränderung vor sich gegangen ist, läßt sich also auch ohne Zusatz von Kalksalzen nachweisen.

Die Azidität des Parakaseins.

Schon Hammarsten (loc. cit.) hatte gezeigt, daß sich das Parakasein aus seinen kalkfreien Lösungen durch Säuren ausfällen und durch Alkali wieder in Lösung bringen läßt. Es besitzt

also offenbar noch die Charaktere einer Säure und seine Lösungen sind als die von Salzen zu betrachten. Aus Hammarstens Angaben erhellt auch, daß die Bildung des Käses in der Milch nicht mit einer sichtbaren Änderung der Reaktion verbunden ist, was auch Söldner (loc. cit.) durch Titrierung mit Phenolphthalein genau feststellte. Auch Courant (loc. cit.) fand, daß eine Kaseinlösung, welche mit einer zur Neutralität ungenügenden Menge Lauge hergestellt worden war, nach Einwirkung des Labferments zur Neutralität auf Phenolphthalein genau die gleiche Menge Natronlauge wie vorher verbrauchte. Die von mir mit größter Sorgfalt wiederholten Versuche führten zu dem gleichen Ergebnis. Die Azidität des Parakaseins ist also, soweit sich dies durch Titrierung feststellen ließ, die gleiche wie die des Kaseins.*)

Die elektrische Leitfähigkeit der Parakaseinlösungen.

Daß kein wesentlicher Unterschied in der Azidität besteht, zeigen auch die Leitfähigkeitsversuche. Bei Untersuchung der Leitfähigkeit der Parakaseinlösungen ergab sich, daß sie bei Lösungen, die etwa 55 Proz. der zur Neutralität nötigen Natronlauge enthielten, keine wesentlich andere als die der Kaseinlösungen war. Die Unterschiede betrugen nur wenige Prozente; meist lag allerdings die Differenz in der Richtung, daß das Parakasein etwas besser leitete. Als Mittel aus 29 Versuchen ergab sich, daß $\varkappa$, die spezifische Leitfähigkeit des Parakaseins, um 2,17 Proz. höher war.

Die innere Reibung der Parakaseinlösungen.

Beträchtlich größere Unterschiede zeigte die innere Reibung. In der Tabelle XI seien einige Versuche wiedergegeben.

Die oberen Zahlen bedeuten wieder die Kasein-, die unteren Parakaseinlösungen. Die Bezeichnungen wie oben; in der letzten Reihe steht der prozentuale Unterschied zwischen den Ergebnissen, und zwar in der oberen Zeile der beiden inneren Reibungszahlen η, in der unteren der beiden Konstanten $\log B = \frac{\log \eta}{\text{\% Kasein}}$, also wenn P Parakasein, K Kasein bedeutet, ist die obere Zahl gleich $(100 - \frac{\eta_P}{\eta_K} . 100)$, die untere $(100 - \frac{\log B_P}{\log B_K} . 100)$.

*) Leider habe ich erst nach Abschluß meiner Versuche von Untersuchungen von Raudnitz (Ergebnisse, Asher-Spiro II 1, 2. Sammelreferat über die Arbeiten aus der Milchchemie, Monatsschrift für Kinderheilkunde 2) über den gleichen Gegenstand Kenntnis erhalten. Raudnitz' Werte für die Fällungsgrenzen wie für die Azidität des Parakaseins sind höher. Eine endgiltige Erklärung dieser Abweichung können, wie ich aus einer brieflichen Auseinandersetzung ersehe, weder Raudnitz noch ich geben.

Tabelle XI.

% Kasein bzw. Parakasein	n	% Azidität	η	log B. 10^2	Differenzen
2,82	0,01372	54,0	2,257	12,5	17,6
			1,855	9,55	23,6
3,70	0,01865	56,0	2,882	12,4	14,0
			2,48	10,7	13,6
1,85	0,009325	„	1,71	13,6	11,4
			1,515	9,75	22,5
3,78	0,01904	55,5	2,89	12,2	19,4
			2,33	9,71	20,4
1,89	0,00952	„	1,68	11,9	9,5
			1,52	9,62	19,1
0,945	0,00476	„	1,27	11,0	5,5
			1,20	8,40	23,8

Diese Tabelle lehrt uns, daß bei den konzentrierteren Lösungen der Unterschied in der inneren Reibung von Kasein und Parakasein 20 Proz. und mehr ist, die Konstante 14 bis 24 Proz. Differenz aufweist. Hierbei möchte ich noch erwähnen, daß Gutzeit*) in der Milch nach Zufügung von Lab, bevor noch sichtbare Fällung eintritt, eine Änderung ihrer Viskosität erhielt, die meinen Versuchen direkt entgegengesetzt liegt: die veränderte Milch soll eine stärkere Reibung besitzen. Die Erklärung für diese Differenz ist wohl in den wesentlich komplizierteren Verhältnissen, welche die Benutzung der Milch bedingt, zu suchen.

Die Abhängigkeit der Labwirkung von der Reaktion.

Die eben besprochenen Methoden gestatten uns auch eine andere für die Theorie der Labwirkung wichtige Frage zu entscheiden, nämlich welche Bedeutung die Reaktion für die Labgerinnung hat, und zwar, ob durch zunehmende OH'-Konzentration die erste Phase: Wirkung des Ferments, oder die zweite: Ausfällung des Parakaseins durch Chlorcalcium leide.

Schon Söldner (loc. cit.) und Courant (loc. cit.) hatten gefunden, daß bei Zusatz von Laugen zu den für Lab gerinnbaren Lösungen (Milch, sog. Dikaseinlösung) die Gerinnung verzögert, bzw. überhaupt verhindert wird. Desgleichen gab de Jager (loc. cit) an, bei welcher Laugenkonzentration das Optimum der Gerinnung liegt. In jüngster Zeit untersuchte Weitzel**) wiederum

*) Gutzeit, Milchzeitung **24** (zit. nach Fuld, Ergebn. d. Physiol. **1**, 1, 468).

) Weitzel, Mitteilg. aus d. Kaiserl. Gesundheitsamt **19, 126 (1902).

den Einfluß von verschiedenen OH' dissoziierenden Stoffen, wie Borax, kohlensaurem Natrium usw.

Auch ich fand, wenn ich diese Kaseinlösungen nach Zusatz der erforderlichen Menge von Chlorcalcium mit Lab versetzte, wie die folgende Tabelle zeigt, daß die Gerinnung als ganzer Prozeß (Umwandlung in Parakasein und folgende Fällung) unvollkommener wurde bis zu ihrem völligen Mangel.

Tabelle XII.

Abhängigkeit der Gerinnung der Kaseinlösung von der Azidität

% relative Azidität des Kaseins	Art der Gerinnung
55	sehr gut, festes Gerinnsel, Filtrat klar
65,2	gut, Filtrat
76,2	„ „ klar
85,0	mäßig, Filtrat opaleszent
87,2	kaum merklich
92,2	feinste Fällung
96,5	nicht
100	„

Auf Grund dieser Versuche, wie der der früheren Autoren, ist aber nicht zu sagen, welche der beiden Gerinnungsphasen durch die wachsende OH'-Konzentration gestört wird. Durch die oben angewandten Methoden, die ermöglichen, die erste Phase der Gerinnung allein zu beobachten, zeigte sich, daß die Wirkung des Ferments selbst geschwächt wird.

Wenn man Lab auf die verschiedenen Kaseinnatriumlösungen mit abnehmender Azidität einwirken läßt, so rücken die mit Ammonsulfat bestimmten Fällungsgrenzen der unveränderten Kaseinlösungen und der mit Lab versetzten immer näher aneinander.

Einfluß der Reaktion auf die Umwandlung des Kaseins in Parakasein.
(Fällbarkeit durch Ammonsulfat.)

Tabelle XIII.

% Kasein bzw. Parakasein	% Azidität	Fällungsgrenze		
		untere	obere	oberste
4,015	71,4	2,5	3,2	3,6
		2,4	2,7	3,4
2,102	76,2	2,4	3,2	3,8
		2,4	2,8	3,8
2,144	85,0	2,6	3,4	3,8
		2,2	3,0	3,8
3,716	92,2	2,6		
		2,6		

In der Leitfähigkeit waren die Unterschiede zwischen Kasein und Parakasein in den sauren Lösungen schon so gering, daß sich kaum sicheres aussagen ließ. In den neutralen Lösungen sind sie noch geringer; es ergibt sich aus 8 Versuchen eine Differenz von — 0,95 Proz. gegen + 2,17 Proz., die aber in entgegengesetzter Richtung liegt, als bei den sauren Lösungen, d. h. also die Leitfähigkeit der mit Lab versetzten neutralen Lösungen ist um 0,95 Proz. niedriger als die in den mit gekochtem Lab behandelten.

Deutlich wird der Einfluß der OH-Ionen auf die Labwirkung durch die inneren Reibungszahlen, wie Tabelle XIV zeigt.

Einfluß der Reaktion auf die Umwandlung des Kaseins in Parakasein.
(Innere Reibung.)

Tabelle XIV.

% Kasein bzw. Parakasein	% Azidität	η	log B. 10^2	Differenzen
2,82	54,0	2,257	12,5	17,6
		1,855	9,55	24,0
2,74	65,1	2,198	12,6	11,1
		1,955	10,6	15,0
2,008	71,4	1,745	12,0	7,5
		1,615	10,38	13,5
2,65	84,6	2,30	13,61	7,6
		2,125	12,35	9,4
2,144	85,0	2,018	14,20	2,8
		1,96	13,6	4,0
3,716	92,2	3,69	15,2	0,0
		3,69	15,2	0,0
3,024	100	2,46	12,9	+ 2
		2,51	13,2	+ 2

Die Unterschiede werden immer kleiner, verschwinden schließlich und schlagen sogar in die entgegengesetzte Richtung um.

Diese Versuche zeigen, daß mit abnehmender Azidität die Umwandlung des Kaseins in Parakasein allmählich aufhört.

Es bleibt noch weiter zu untersuchen, ob das Lab durch die steigende OH'-Konzentration nur gelähmt, d. h. an der Wirkung unter dieser bestimmten Konzentration verhindert, oder ob es

dadurch wirklich zerstört ist. Wie folgender Versuch beweist, ist das letztere der Fall.

Läßt man auf eine neutrale Lösung Lab einwirken, und löst nun in dieser Lösung Kasein auf, so daß die entstehende Lösung nur etwa 50 Proz. der zur Neutralität nötigen Lauge enthält, setzt nun die zur Ausfällung genügende Menge Chlorcalcium zu, so tritt keine Gerinnung ein; 1 Tropfen neuen Labs hat sehr gute Gerinnung zur Folge.

Wird nun aber auch das Lab durch die bei neutralen Lösungen vorhandene OH'-Konzentration zerstört, so bleibt die bei geringerer Konzentration in der sauren Lösung eingetretene Umwandlung durch nachträglichen Zusatz von Natronlauge erhalten.

Lassen wir Lab auf eine Lösung des sauren Kaseinsalzes einwirken, neutralisieren dann die Lösung für Phenolphthalein, fügen zu der jetzt neutralen Lösung Chlorcalcium, so tritt sofort Gerinnung ein; allerdings ist diese nie so gut wie in den sauren Lösungen. Es liegt dies wohl an der teilweisen Löslichkeit des Käses in der beträchtliche Mengen von OH' enthaltenden Lösung.

Die Unzerstörbarkeit der einmal eingetretenen Labwirkung beweist auch die innere Reibung dieser nachträglich neutralisierten Lösung. Tabelle XV enthält einige Belege.

In der zweiten Spalte bedeuten die unteren Zahlen den Prozentsatz der zur Neutralität nötigen Lauge, welche die Lösung bei Einwirkung des Ferments hatte.

Innere Reibung neutraler Parakaseinlösungen.

Tabelle XV.

% Kasein	% Azidität	η	log B. 10^2	Differenzen
2,96	100	2,48	1,33	10,5
	(55,5)	2,22	1,17	12,0
2,26	104	1,95	1,28	8,6
	(54)	1,78	1,11	13,3
1,31	100	1,45	1,23	4,0
	(56,2)	1,39	1,09	11,0
1,345	100	1,488	1,28	5,0
	(67,5)	1,415	1,12	12,5

Der Einfluß der Reaktion auf die Umwandlung des Kaseins durch Lab besteht also im wesentlichen darin, daß schon durch eine geringe Menge von Hydroxylionen das Labferment zerstört wird.

III.

Theorie der Labwirkung.

Zweiphasigkeit.

Vergleichen wir nun auf Grund der jetzt besprochenen experimentellen Tatsachen die Kasein- und Parakaseinlösungen, so fällt neben der verschiedenen Fällbarkeit durch Salze als deutlichster Unterschied die Differenz in ihrer inneren Reibung auf. Zunächst ist hierdurch die zweiphasige Natur des Gerinnungsprozesses absolut sicher gestellt; die Wirkung des Labs auf das Kasein tritt ohne jede Anwesenheit von Calciumionen ein. Die Vorstellung de Jagers, das Lab führe dem Kaseinsalz statt des Natrium Calcium zu, erledigt sich von selbst; desgleichen die der französischen Autoren, daß Lab und Chlorcalcium dieselbe Wirkung habe, nämlich Kasein zu fällen.

Wirkung des Labs.

Welche Veränderungen gehen bei der Wirkung des Labs vor sich?

Ich glaube, daß die obigen Ergebnisse sich am besten dem Rahmen der Hammarstenschen (loc. cit.) Vorstellung einfügen, das Lab wirke spaltend auf das Kaseinmolekül; allerdings darf man sich dabei nicht vorstellen, daß es sich hier um eine so tiefgreifende und allmählich fortschreitende Zerlegung des Kaseinmoleküls handle, wie sie unter dem Einfluß des Pepsins oder Trypsins erfolgt, sondern das Lab wirkt wohl in der Weise, daß es aus dem großen Molekül des Kaseins einen verhältnismäßig kleinen Teil abspaltet.

Von den gefundenen Differenzen zwischen Kasein und Parakasein ist die in der inneren Reibung beider Körper am deutlichsten, die innere Reibung des Parakaseins ist geringer und zwar bis um 20 Proz.

Zur Erklärung des Unterschiedes kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Wir sahen oben, daß die innere Reibung von Eiweißlösungen im allgemeinen von der Größe der Eiweißionen bedingt ist und bei demselben Salze, in Lösungen mit verschiedenem Prozentgehalt, sich durch die Ionenkonzentration unterscheidet. Finden wir nun eine so bedeutende Abnahme der inneren Reibung in den Kaseinlösungen nach Einwirkung des Labferments, so kann entweder eine Veränderung in der Größe der Anionen (Abspaltung) oder eine Abnahme der Ionenkonzentration stattgefunden haben.

Ziehen wir die Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessungen zu Rate, so sehen wir, daß mehr für die erste Annahme spricht; denn die Leitfähigkeit der Parakaseinlösungen scheint eine höhere zu sein; dies verträgt sich besser mit der Annahme einer Spaltung, da durch diese die Ionenbeweglichkeit im allgemeinen eine größere wird. Ein Rückgang der Eiweißkonzentration und ihr Ersatz durch die viel schnelleren OH' hätte allerdings das gleiche Ergebnis: Zunahme der Leitfähigkeit. Die Annahme des Wachsens der OH'-Konzentration wird aber durch die obigen Aziditätsversuche widerlegt, da wir nach Einwirken von Lab genau die gleiche Menge Lauge zur Neutralisierung brauchen, wie vor diesem.

Daß die prozentische Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit in den Parakaseinlösungen so gering ist, etwa 2 Proz. im Verhältnis zur Abnahme der inneren Reibung, die an 20 Proz. beträgt, läßt sich folgendermaßen erklären.

Schon wiederholt ist darauf hingewiesen, daß die Leitfähigkeit, eine Funktion von $(u + v)$, wo u Beweglichkeit des Kations, v die des Anions ist, hauptsächlich, bei der verschiedenen Größenordnung von u und v, in unsern Natriumkaseinlösungen von u abhängen wird, die innere Reibung dagegen hauptsächlich von dem unbeweglicheren Ion (v), denn sie wird mit wachsendem Molekulargewicht und abnehmender Ionenbeweglichkeit größer. Eine der einfachsten Funktionen, die dies ausdrückte, wäre unter Fortlassung der inneren Reibung von undissoziierten Molekeln, die nach obigen Versuchen gering gegen die der Ionen sein muß: $\eta = k.\left(\frac{1}{u}+\frac{1}{v}\right)$. In dieser ist ersichtlich, daß $\frac{1}{v}$, wenn $v < u$ ist, den bedeutenderen Einfluß auf den Gesamtwert η hat. (v ist nach den Leitfähigkeitsbestimmungen etwa $^1/_4$ von u.)

Andert sich nun, wie wir oben annahmen, durch das Labferment v, d. h. wird es größer, weil das Ion gespalten wird, so verstehen wir, warum der Wert der Funktion $(u + v)$ zunimmt, aber nur wenig, der der Funktion $\frac{1}{u}+\frac{1}{v}$ abnimmt und zwar wesentlich mehr.

Endlich sind die Verschiedenheiten in den Fällungsgrenzen von Kasein und Parakasein ein Ausdruck für Veränderung des Kaseinmoleküls. Es beginnt die Fällung früher, die Hauptmasse des Parakaseins ist auch wesentlich zeitiger gefällt (obere Fällungsgrenze) und auch die oberste Fällungsgrenze, welche völlige Ausfällung des Kaseins anzeigt, ist ebenfalls, wenn auch wenig, tiefer. Daß die obere und oberste Fällungsgrenze so weit

auseinander liegt, erweckt besonders den Anschein, daß wir es mit zwei verschiedenen Körpern zu tun haben, von denen der eine, in geringerem Grade vorhandene, später ausfällt.

Eine genauere Prüfung dieser Verhältnisse, eventuell mit andern Fällungsmitteln, könnte zur Isolation der Spaltungsprodukte führen. Ich will hier nur noch erwähnen, daß ich es sehr wohl für möglich halte, daß die eben besprochene Vorstellung, das Labferment spalte einen Teil aus dem Kaseinmolekül ab, auf Grund neuer Tatsachen wird geändert werden müssen. Zur Zeit aber scheint sie mir dem vorhandenen Material am ehesten zu genügen, besser als die letzthin geäußerte Vermutung: das Lab wirke synthetisch.*)

Zum Schluß erfülle ich gern die angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Franz Röhmann für Anregung und Rat bei dieser Arbeit, sowie für das liebenswürdige Interesse, das er mir während meiner Studienzeit bewiesen hat, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

*) Pawlow und Parastschuk, Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 413 (1904).

XV.

Über die Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde nach Alanindarreichung.

Von Dr. **Marco Almagia** (Rom) und Dr. **Gustav Embden,**
Vorstand des chemischen Laboratoriums am städt. Krankenhause.

Aus der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses zu Frankfurt a. M. Oberarzt: Professor Dr. v. Noorden.

Die Bildung von Zucker im Tierkörper aus Substanzen nicht kohlehydratartiger Natur darf zwar als feststehende Tatsache gelten, aber über die Art dieser Zuckerbildung ist nur äußerst wenig Sicheres bekannt. Nicht einmal die Frage, ob Eiweißkörper oder Fette oder beide dem Organismus das Material zum Bau des Zuckers liefern, darf als endgiltig abgeschlossen betrachtet werden.

Aber auch wenn das der Fall wäre, wenn wir es zum Beispiel als abgemacht betrachten wollten, daß nur aus Eiweißkörpern Kohlehydrate entstehen können, von einem wirklichen Verständnis der Zuckerneubildung sind wir auch dann noch sehr weit entfernt. Nur die Kenntnis aller intermediären bei der Umformung von Eiweiß zu Zucker sich abspielenden chemischen Vorgänge kann dieses Verständnis vermitteln, und es darf daher nicht wundernehmen, daß alle über den eigentlichen Chemismus der Zuckerbildung aus Eiweiß und Eiweißspaltungsprodukten geäußerten Anschauungen fast rein hypothetischer Natur sind.

Da die bisherigen Versuche, an isolierten lebensfrischen Organen eine synthetische Bildung von Zucker zu erzielen*), als fehlgeschlagen zu betrachten sind, so bleibt als einzige in Betracht kommende Untersuchungsmethode der Fütterungsversuch, sei es, daß man an gesunden Tieren Glykogenablagerung oder an diabetischen Zuckerausscheidung zu erzielen sucht. Alle Schluß-

---

*) Eine genauere Erörterung dieses Punktes findet sich in einer demnächst in diesen Beiträgen erscheinenden Arbeit von Claus und Embden.

folgerungen aus Fütterungsversuchen sind naturgemäß stets indirekte, und die Beweiskraft aller derartigen Versuche ist daher selbstverständlich niemals eine ganz absolute.

Für eine große Anzahl früherer Versuche ist — wie Pflüger*) mit Recht hervorhebt — nicht einmal der Nachweis erbracht, daß die beobachtete Glykogenablagerung oder Zuckerausscheidung sich nicht einfach aus dem Kohlehydratvorrat des Organismus herleitet, aber auch dort, wo der Beweis geführt ist, daß die verfütterte Substanz wirklich den Kohlehydratbestand des Organismus vermehrte, darf man selbstverständlich diese Substanz nicht ohne weiteres als Quelle des neugebildeten Kohlehydrats ansprechen.

Die erste Aufgabe aller derartiger Fütterungsversuche wird also die sein, zu zeigen, daß die verfütterte Substanz die Kohlehydrate wirklich vermehrte, die zweite, schwierigere, zu verfolgen, wie diese Vermehrung vor sich ging.

Die Fähigkeit, Neubildung von Kohlehydraten im Tierkörper hervorzurufen, ist bisher nur für die Eiweißkörper bewiesen, teils schon durch ältere Versuche, teils in besonders schlagender Weise durch neuere Untersuchungen Lüthjes**).

Daß auch Aminosäuren eine Kohlehydratbildung hervorzurufen imstande sind, ist bisher nicht als einwandsfrei erwiesen zu betrachten. Zwar konnten Langstein und Neuberg***) feststellen, daß die Leber hungernder Kaninchen nach Alanindarreichung einen auffällig hohen Glykogengehalt aufwies, und Friedrich Kraus***) fand, daß die Zuckerausscheidung phloretinvergifteter Hungerkatzen bei Alaninfütterung unter Umständen steigt, und namentlich führten Embden und Salomon†) den Nachweis, daß bei pankreaslosen Hunden Alanin, Glykokoll, und wie früher schon Nebelthau††) gezeigt hatte, auch Asparagin außerordentlich erhebliche Steigerungen der Zuckerausscheidung hervorrufen, die Deutung dieser Befunde aber war eine unsichere. Es ließ sich auch bei den letztgenannten Ver-

*) E. Pflüger, Glykogen. Pflügers Archiv **96**, 227 ff. (1903).

) H. Lüthje, Die Zuckerbildung aus Eiweiß. Deutsches Archiv f. klin. Medizin **79, 499 (1904). — Derselbe, Zur Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß. Pflügers Archiv **106**, 160 (1904).

***) C. Neuberg und L. Langstein, Archiv f. Anatomie und physiologische Abteilung 1903, S. 514.

†) G. Embden und H. Salomon, Diese Beiträge **5**, 508 (1904).

††) E. Nebelthau, Experimenteller Beitrag zur Lehre von der Zuckerbildung im diabetischen Organismus. Münchener med. Wochenschrift 1902, S. 917.

suchen, bei denen der Einfluß der Aminosäurenzufuhr auf die Zuckerausscheidung bei weitem am ausgesprochensten war, die Möglichkeit nicht mit Sicherheit ausschließen, daß die verfütterten Aminosäuren nur durch irgend welche Einwirkung auf noch vorhandene Glykogendepots zur Vermehrung der Glykosurie führten. Diese Möglichkeit soll in der vorliegenden Arbeit einer experimentellen Prüfung unterzogen werden.

Methodik. Wir stellten unsere Versuche an 5 pankreaslosen Hunden an. Vor der Pankreasexstirpation wurden sämtliche Hunde mit einer gemischten Kost (Küchenabfällen) reichlich ernährt. Nach der Operation erhielten alle Tiere kein Futter mehr. Drei Hunde wurden nach Ablauf etwa einer Woche getötet und in den als Glykogendepots in Betracht kommenden Organen wurde der Glykogengehalt im wesentlichen nach der abgekürzten Methode Pflügers*) bestimmt. Nur war es bei den in Frage kommenden geringen Glykogenmengen notwendig, die wässerigen Lösungen der Glykogenniederschläge vor der Salzsäurespaltung vorsichtig bei neutraler Reaktion einzuengen. Der Zucker wurde schließlich außer auf polarimetrischem auch auf titrimetrischem Wege bestimmt. Die beiden übrigen Hunde erhielten in der zweiten Woche nach der Operation teils per os — teils subkutan — große Mengen r-Alanin, ohne daß ihnen auch während dieser Versuchsperiode irgend welche andere Nahrung zugeführt wurde. Die während dieser Periode ausgeschiedenen Zuckermengen wurden verglichen mit den Zuckerwerten, die sich aus dem Glykogenbestand der nach einer Woche getöteten Tiere herleiten ließ.

Wir setzten voraus, daß der Glykogengehalt der beiden alaningefütterten Tiere eine Woche nach der Operation von ähnlicher Größenordnung wäre, wie der Glykogenbestand der in gleicher Weise vorbehandelten Kontrolltiere um dieselbe Zeit, und suchten so Aufschluß darüber zu gewinnen, ob die nach der Alaninfütterung beobachtete Zuckerausscheidung sich aus dem Glykogenvorrat der Tiere herleiten ließe oder nicht.

Ehe wir nunmehr auf die Schilderung der einzelnen Versuche eingehen, sei bemerkt, daß die Zuckerbestimmungen im Harn — mit Ausnahme einiger weniger Versuchstage — außer auf polarimetrischem auch auf titrimetrischem Wege ausgeführt wurden. Beide Methoden lieferten stets ausreichend überein-

---

*) E. Pflüger, Abgekürzte quantitative Analyse des Glykogens. Pflügers Archiv **103**, 169 (1904).

stimmende Resultate. Den Berechnungen sind die polarimetrisch gewonnenen Werte zugrunde gelegt. Auf die für die Mehrzahl der Versuchstage ermittelten Harnstickstoffzahlen wird ebenfalls einzugehen sein.

Wir geben nunmehr die Versuche in der Reihenfolge, in der sie ausgeführt wurden, wieder.

Versuch I. Spitzartige Hündin. Totalexstirpation des Pankreas am 28. Juli 1904.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6
Datum 1904	Harnmenge	Zucker polarimetrisch Proz.	Zucker titrimetrisch Proz.	Aus der polarimetrischen Zuckerbestimmung berechnete Zuckermenge g	Bemerkungen
28. 7. bis 30. 7. nachm., mittags	288	8,1		23,3	
30. 7. mittags 31. 7. mittags	405	4,8	4,83	19,4	Gewicht des Hundes am 30. 7. 5300 g
31. 7. bis 1. 8.	202	4,5	4,6	9,1	
1. 8. bis 2. 8.	310	3,8	3,90	11,8	
2. 8. bis 3. 8.	160	4,2	4,3	6,7	
3. 8. bis 4. 8.	138	5,1		7,0	Der gleichzeitig operierte Kontrollhund wird am 4. 8. nachm. getötet
4. 8. bis 5. 8.	165	2,4	2,7	4,0	
5. 8. bis 6. 8.	69	2,4	2,64	1,7	
6. 8. bis 7. 8.	455	2,5	2,50	11,4	20 g Alanin in 100 ccm Wasser per os in drei Portionen
7. 8. bis 8. 8	390	3,7	3,67	14,4	20 g Alanin in zwei Portionen per os
8. 8. bis 9. 8.	455	3,8	3,81	17,3	30 g Alanin in drei Portionen per os, Gewicht des Hundes 4050 g
9. 8. bis 10. 8.	550	2,5	2,74	13,8	24 g Alanin in zwei Portionen per os
10. 8. bis 11. 8.	Portion A. 195 Portion B. 405	2,3 3,4		18,3	Nach 15 g Alanin erbricht der Hund, weitere 15 g Alanin werden vollständig behalten

Aus der Tabelle I ersehen wir, daß die Zuckerausscheidung des Hundes eine etwas schwankende ist, im ganzen aber zeigt sich vom dritten Tage der Operation bis zum neunten ein Absinken der Glykosurie von 19,4 g auf 1,7 g. Vom zehnten Tage ab erhält das Versuchstier täglich r.-Alanin per os. Der Einfluß der Alaninfütterung auf die Zuckeraus-

scheidung ist nahezu ebenso ausgesprochen, wie in den früheren Versuchen von Embden und Salomon. In der Zeit vom 6. bis zum 11. August, also während 5 Tagen, wurden dem Tier, wie aus der Tabelle I ersichtlich, im ganzen 124 g r-Alanin verabreicht und während dieser Zeit wurden 75,2 g Zucker ausgeschieden, während in der vorausgehenden 9tägigen Periode, in der der Hund nur Wasser erhielt, 83 g Dextrose im Harn gefunden wurden.

Bevor wir auf die weitere Erörterung dieses Versuches eingehen, wollen wir auf die Zuckerausscheidung eines zweiten, am gleichen Tage operierten Hundes, dessen Gewicht nur wenig größer als das des eben besprochenen Hundes war, hinweisen.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6
Datum 1904	Harnmenge	Zucker polarimetrisch Proz.	Zucker titrimetrisch Proz.	Aus der polarimetrischen Zuckerbestimmung berechnete Zuckermenge g	Bemerkungen
28. 7. nachm. 30. 7. mittags	383	6,2		23,7	
30. 7. mittags 31. 7. mittags	460	3,3	3,27	15,2	Gewicht am 30. 7. 5720 g
31. 7. bis 1. 8.	230	4,0	3,95	9,2	
1. 8. bis 2. 8.	214	5,8	5,90	12,4	
2. 8. bis 3. 8.	225	5,8	6,10	13,0	
3. 8. bis 4. 8.	188	4,8		9,0	Der Hund wird getötet am 4. 8. nachmittags, Gewicht beim Tode 4720 g

Wir sehen aus der Tabelle II, daß die Zuckerausscheidung während der ersten 5 Tage nach der Operation der des ersten Hundes außerordentlich ähnlich ist; während der beiden folgenden Tage ist sie etwas höher. Im ganzen scheidet dieser zweite Hund in den 7, der Pankreasexstirpation folgenden Tagen 82,5 g Zucker aus, während der erste Hund in der gleichen Periode 77,3 g Zucker lieferte. Am Ende des siebenten Tages wurde der zweite Hund getötet und mit den im wesentlichen in Betracht kommenden Organen Glykogenbestimmungen vorgenommen. Der Hund war nicht nur sehr fettarm, sondern auch die Muskulatur war im höchsten Maße geschwunden.

Das Resultat der Glykogenbestimmungen war folgendes:

1. Die Leber (verarbeitet wurden 100 g) erwies sich als vollkommen glykogenfrei.

2. Die Muskulatur (es kamen 100 g Muskeln, die von verschiedenen Extremitäten gewonnen wurden, zur Verwendung) lieferte 0,48 Proz. Zucker aus Glykogen.

3. Das Herz (50 g) wurde ganz verarbeitet. Die aus dem Glykogen gewonnene Zuckermenge betrug 0,58 g.

4. In den Nieren und den Lungen waren höchstens Spuren von Glykogen vorhanden.

Das Tier wog bei seinem Tod 4720 g. Nehmen wir das Gewicht der Muskulatur zu 40 Proz. des Gesamtgewichts des Hundes an, und legen wir die aus den Extremitäten gewonnenen Glykogenwerte denen für die Gesamtmuskulatur zugrunde, was zu wenigstens annähernd richtigen Ergebnissen führen dürfte, so würde dieses Tier aus dem Gesamtglykogen seiner Körpermuskulatur kaum mehr als 9 g Zucker bilden können. Die im Herzen und den übrigen untersuchten Organen gefundenen Glykogenmengen kommen als Zuckerquelle praktisch nicht in Betracht, denn wir veranschlagen die gesamte, im Herzen, den Nieren und den Lungen vorhandene Glykogenmenge sicher zu hoch, wenn wir sie mit 1 g ansetzen. Das in den untersuchten Organen vorhandene Glykogen konnte also etwa 10 g Zucker liefern, und da sich die Untersuchung auf alle praktisch als Glykogenlager in Betracht kommenden Organe erstreckte, war die Menge des aus dem Gesamtglykogen des Tieres ableitbaren Zuckers sicher nicht wesentlich größer.

Die Gesamtzuckerausscheidung des am gleichen Tage operierten Hundes I vom achten bis zum vierzehnten Tage nach der Operation betrug 80,9 g, wovon, wie bereits oben erwähnt, 75,2 g auf die fünftägige Alaninperiode entfallen.

Würden diese vom achten Tage ab ausgeschiedenen 80 g Zucker dem Glykogenvorrat des Körpers entstammen, so müßte dieser Vorrat zum mindesten etwa achtmal größer sein als der des Hundes II, er würde also einer völlig anderen Größenordnung angehören, und das, trotzdem der Verlauf des Diabetes bei den beiden Hunden, wie oben ausgeführt, ein so überaus ähnlicher war.

Die folgenden Versuche fielen in ganz demselben Sinne aus und lieferten einige weitere, wie wir glauben, recht bemerkenswerte Ergebnisse. (Siehe Tabelle III auf S. 304.)

Aus der umstehenden Tabelle (III) ist die Zucker- und Stickstoffausscheidung des dritten Hundes zu ersehen.

Der Hund wog zur Zeit der Operation 6000 g. Während der ersten 7 Tage nach der Operation erhielt er keinerlei Nahrung; er schied während dieser Zeit im ganzen 65,9 g Zucker aus. Die Menge des ausgeschiedenen Zuckers sinkt von 15 g auf 3,8 g am siebenten Tage. Vom achten bis zum zwölften Tage erhielt der Hund im ganzen 140 g r-Alanin, die allerdings zum Teil erbrochen werden. Er scheidet während dieser 5tägigen Alaninperiode nahezu 83 g Zucker aus. Am letzten Tage dieser Periode verfiel der Hund nach einer besonders reichlichen Alaningabe in

einen Zustand von Coma. Doch erholte sich das Tier am nächsten Tage; es erhielt an diesem und dem folgenden Tage (dem 13. und 14. nach der Operation) keinerlei Nahrung und schied an diesen beiden Tagen zusammen 12,1 g Zucker aus.

Vor der ersten Fütterung wog der Hund 3900 g.

Tabelle III.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Datum 1904	Harnmenge ccm	Zucker polarimetr. Proz.	Zucker titrimetr. Proz.	Aus der pol. Zuckerbest. ber. Zuckermenge g	N im Harn	D:N	Bemerkungen
12. 11. bis 14. 11.	580	3,8	4,06	22,0	7,42	2,96	Gewicht des Hundes 6000 g. Kein Futter
14. 11. bis 15. 11.	535	2,8	2,95	15,0	5,93	2,53	Kein Futter
15. 11. bis 16. 11.	360	2,4	2,56	8,7	4,82	1,80	Kein Futter
16. 11. bis 17. 11.	230	3,8	3,8	8,7	6,62	1,31	Kein Futter
17. 11. bis 18. 11.	240	3,2	3,35	7,7	4,56	1,69	Kein Futter
18. 11. bis 19. 11.	165	2,3		3,8	3,50	1,08	Kein Futter
19. 11. bis 20. 11.	420	3,75	3,73	15,7	3,64	**4,31**	Kein Futter, um 10 Uhr 10 g Alanin in 50 g Wasser, um 12 U. 15 Min. Erbrechen, um 2 U. 10 g Alanin in Wasser per os, um 7 U. 10 g Alanin in Wasser per os
20. 11. bis 21. 11.	575	2,85	3,14	16,4	6,47	2,53	Im Laufe des Tages 20 g Alanin per os, kein Erbrechen
21. 11. bis 22. 11.	540	3,2	3,45	17,3	[6,22]	[2,78]	30 g Alanin im Laufe des Tages per os, kein Erbrechen
22. 11. bis 23. 11.	300	3,6	3,8	10,8	[4,45]	[2,43]	10 g Alanin um 12 Uhr 45, 10 g Alanin um 4 Uhr, $^1/_2$ Stunde später Erbrechen
23. 11. bis 24. 11.	588	3,85		22,6	[5,44]	**[4,15]**	Mittags 10 g Alanin per os, nach einigen Minuten Erbrechen, 4 Uhr 10 g subkutan, 6 Uhr 10 g subkutan, 6 Uhr 10 g per os, danach comaartiger Zustand
24. 11. bis 25. 11.	255	3,0		7,65	3,92	1,95	Kein Futter: Wesentliche Besserung des Befindens
25. 11. bis 26. 11.	145	3,1	3,3	4,49	2,76	1,63	Kein Futter
26. 11. bis 27. 11.	340	4,0		13,6			Der Hund wird gefüttert Gewicht 3900 g
27. 11. bis 28. 11.	375	3,2		12,0			

Wir wollen an dieser Stelle noch besonders auf das Verhalten des Quotienten D : N bei diesem Hunde hinweisen. Er sinkt von Werten, die sich der Minkowskischen Zahl 2,8 annähern, während der ersten siebentägigen Hungerperiode auf 1,08 ab. Am ersten Tage der Alaninfütterung steigt er auf 4,31 an. Die absolute Stickstoffausscheidung durch den Harn ist an diesem Tage kaum größer, als an dem vorhergehenden Hungertage (3,64 g gegen 3,50 g), trotzdem dem Hunde 30 g Alanin mit etwa 4,7 g Stickstoff zugeführt wurden.*) Derartige Retentionen von eingeführtem Stickstoff sind beim Hungertier bereits öfters beobachtet worden und speziell für das Alanin in einer kürzlich erschienenen Arbeit von Rahel Hirsch**) beschrieben. Am nächsten Tage (20./11. bis 21./11.) steigt die Stickstoffausscheidung erheblich an, aber um kaum mehr, als der am ersten Tage in 20 g Alanin zugeführten Stickstoffmenge entspricht. Die Harnstickstoffwerte für die drei letzten Tage der Alaninperiode sind nicht zuverlässig, da wir nicht mit Sicherheit ausschließen können, daß an diesen Tagen erbrochenes Alanin in den Harn gelangte. Immerhin stellen sie Maximalwerte dar und dementsprechend die während dieser Zeit gefundenen Quotienten D : N Minimalwerte. Am vierten Tage der Alaninperiode wurden 20 g Alanin, am fünften 40 g verabreicht. Der Quotient D : N steigt von 2,43 am vierten auf 4,15 am fünften Tage der Alaninfütterung.

Aus dem Harne dieses Hundes konnte von den Herrn Dr. Plaut und Dr. Reese***) Alanin als Naphtalinsulfoverbindung erhalten werden. Da die gewonnene Verbindung wenigstens zu einem Teil optisch aktiv war, während r-Alanin verabreicht wurde, so handelte es sich sicherlich nicht um eine bloße Verunreinigung des Harns mit erbrochenem Alanin, sondern ein Teil der verabreichten Aminosäure hatte den Organismus des Hundes unverbrannt passiert.

Aus Tabelle IV ist der Verlauf der Zuckerausscheidung und für die Mehrzahl der Tage auch jener der Stickstoffausscheidung des vierten Hundes der Versuchsreihe ersichtlich. (Siehe Tabelle IV auf S. 306)

Der Hund wog am Tage der Operation 8500 g, zu Ende des sechsten Tages nach der Operation 7000 g. Die Gesamtzuckerausscheidung während

---

*) Ein Teil der ersten dem Hunde verabreichten 10 g Alanin wurde allerdings erbrochen. Das erbrochene Alanin gelangte nicht in den Harn.

) Rahel Hirsch, Zeitschr. f. exper. Pathologie und Therapie **1, 144 (1905).

***) Vgl. die im nächsten Hefte dieser Beiträge erscheinende Mitteilung über das Verhalten in den Tierkörper eingeführter Aminosäuren.

der 6 Tage nach der Operation betrug annähernd 132 g. Das Verhältnis D : N ist dauernd ein ziemlich hohes im Gegensatz zu dem Verhalten dieses Quotienten bei dem eben besprochenen Hund 3.

Die Glykogenbestimmung in den Organen dieses am Schlusse des sechsten Tages nach der Operation getöteten Hundes ergab folgende Resultate, wobei wir der Berechnung die polarimetrisch ermittelten Werte, welche etwas höher als die titrimetrisch gewonnenen sind, zugrunde legen.

1. Aus der ganz verarbeiteten Leber wurden unbestimmbare Spuren Zucker aus Glykogen gewonnen.

2. Aus der Muskulatur der hinteren Extremitäten 0,18 Proz. Zucker aus Glykogen.

3. Aus der Muskulatur der vorderen Extremitäten 0,24 Proz. Zucker aus Glykogen (verarbeitet je 100 g Muskulatur).

4. Die Bestimmung des Glykogens in Herz und Zwerchfell ging leider verloren.

5. Beide Nieren (Gewicht 50 g) und Lungen (66 g) enthielten ebenso wie 100 g Darm und Magen und 50 g Haut keine bestimmbaren Glykogenmengen.

Tabelle IV.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Datum 1904	Harnmenge ccm	Zucker polarimetr. Proz.	Zucker titrimetr. Proz.	Aus der pol. Zuckerbest. ber. Zuckermenge g	N im Harn g	D:N	Bemerkungen
11. 11. bis 13. 11. mittags	345	7,6	7,2	26,2			Gewicht des Hundes: 8500 g
13. 11. bis 14. 11.	460	5,4	5,7	24,8	9,75	2,54	
14. 11. bis 15. 11.	420	4,35	4,5	18,3	6,21	2,95	
15. 11. bis 16. 11.	430	6,4	6,7	27,5			
16. 11. bis 17. 11.	325	8,15	8,6	26,5	9,36	2,83	Gewicht des Hundes am 16. 11. 7000 g
17. 11. mittags bis 17. 11. nachm.	120	7,2		8,6	3,25	2,65	Getötet am 17. 11. nachmittags

Auch hier kommt also, ebenso wie in dem oben besprochenen Versuche 2 als Glykogendepot praktisch lediglich die Muskulatur in Betracht. Legen wir der Berechnung den für die Muskulatur der vorderen Extremitäten gefundenen höheren Wert zugrunde und nehmen wir das Gewicht der Muskulatur wiederum zu 40 Proz. des Körpergewichts an, so hätte der Hund noch nicht 7 g Zucker aus seinem Muskelglykogen und nicht wesentlich mehr aus seinem Gesamtglykogen bilden können. Der Hund schied also allein am Tage vor seinem Tode ein Mehrfaches jener Zuckermenge aus, die in ihm zur Zeit seines Todes in Form von Glykogen abgelagert war.

Aus Tabelle V ersehen wir die Zucker- und die Stickstoffausscheidung des fünften pankreaslosen Hundes.

Tabelle V.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Datum 1904	Harnmenge ccm	Zucker polarimetr. Proz.	Zucker titrimetr. Proz.	Aus der pol. Zuckerbest. ber. Zuckermenge g	N im Harn g	D:N	Bemerkungen
7. 12. nachm. bis 9. 12. mittags	200	2,2	2,4	4,4	4,8	0,92	
9. 12. bis 10. 12.	85	3,4	3,6	2,9	2,38	1,22	
10. 12. bis 11. 12.	120	7,4	7,7	8,9	3,76	2,37	
11. 12. bis 12. 12.	62	3,3	3,6	2,0	2,25	0,89	
12. 12. bis 13. 12.	30	2,8		0,8	1,59	0,55	Getötet am 13. 12. mittags, Gewicht vor dem Tode 3130 g

Im Gegensatz zu dem eben besprochenen Versuche erreicht die Glykosurie nur geringe Werte. Während der 6 Tage nach der Pankreasexstirpation wurden nur 19 g Zucker ausgeschieden. Der Quotient D:N ist mit Ausnahme eines Tages, wo er den Wert 2,37 erreicht (10./12. bis 11./12.), ein sehr niedriger. Am Ende des 6. Tages nach der Operation wurde der Hund getötet.

Die vorgenommenen Glykogenbestimmungen hatten folgende Ergebnisse:

1. Die Leber (78 g) und die Lungen (41 g) wurden zusammen ganz verarbeitet.

Es wurden aus beiden Organen 0,082 g Zucker aus Glykogen erhalten.

2. Herz, Zwerchfell, beide Nieren und Milz werden zusammen verarbeitet. Gefundener Glykogenzucker: 0,26 g.

3. 100 g Muskulatur von den vorderen und hinteren Extremitäten. Gefundener Glykogenzucker: 0,069 g = 0,069 Proz.

Die Gesamtglykogenmenge der Muskulatur des zur Zeit seines Todes 3130 g schweren Tieres betrug weniger als 1 g, und die überhaupt in dem Tiere vorhandene Glykogenmenge ist mit 2 g sicher zu hoch geschätzt.

Es ergibt sich also aus den Versuchen 2, 4 und 5 übereinstimmend, daß der Glykogengehalt dieser Hunde 6 bis 7 Tage nach der Operation ein äußerst geringer war, *einerlei, ob nach der Totalexstirpation des Pankreas größere oder geringere Zuckermengen ausgeschieden wurden.*

Trotzdem in den Versuchen 1 und 3 die Hunde in gleicher Weise wie die soeben genannten Tiere vorbehandelt waren, also sicher ähnlich geringe Glykogenmengen enthielten, schieden sie

nach Alanindarreichung äußerst beträchtliche Zuckermengen aus und es kann sonach dieser Zucker nur durch Neubildung von Kohlehydraten im Organismus entstanden sein. Verfütterung von Alanin ruft also beim pankreaslosen Hunde Neubildung von Kohlehydrat hervor.

Ob das Alanin selbst die Muttersubstanz des neugebildeten Zuckers bildete, wie wir glauben möchten, oder ob sein Einfluß auf die Zuckerbildung im Organismus des pankreaslosen Tieres ein mehr indirekter war, darüber geben die vorliegenden Versuche keinen Aufschluß und wir gehen auf diese Frage an dieser Stelle um so weniger ein, als wir sie, von anderen Gesichtspunkten aus, in einer demnächst erscheinenden Arbeit zu besprechen haben werden.

Hier wollen wir nur noch einen Punkt berühren.

Vergleichen wir den Verlauf der Zuckerausscheidung bei den fünf verschiedenen Versuchstieren, so treten uns einige höchst auffällige Tatsachen entgegen.

Sehr auffällig erscheint es zunächst, daß bei den am selben Tage operierten Hunden 1 und 2 die Zuckerausscheidung während der ersten 5 Tage nach der Operation äußerst gleichartig verläuft.

Zum besseren Vergleiche seien die von beiden Hunden während der ersten 7 Tage ausgeschiedenen Zuckermengen hier nochmals nebeneinander gestellt.

Tabelle VI.

Hund I		Hund II	
	Zucker in g		Zucker in g
1. und 2. Tag	23,3	1. und 2. Tag	23,7
3. „	19,4	3. „	15,2
4. „	9,1	4. „	9,2
5. „	11,8	5. „	12,4
6. „	6,7	6. „	13,0
7. „	7,0	7. „	9,0

Diese Gleichartigkeit in der Zuckerausscheidung der beiden Hunde erstreckt sich auf die ersten fünf Tage nach der Operation, und sie ist um so auffälliger, als die Kurve der Zuckerausscheidung bei diesen beiden Tieren keineswegs eine besonders regelmäßige ist.

In Versuch 3 geht, wie ebenfalls bereits hervorgehoben, die Zuckerausscheidung von 15 g am dritten Tage nach der Operation auf weniger als 4 g am siebenten Tage herunter; die Werte D : N werden bei diesem Absinken der Zuckerausscheidung sehr niedrige.

Ganz im Gegensatz hierzu bleibt im vierten Versuch die ausgeschiedene Zuckermenge dauernd eine sehr hohe und ebenso der Quotient D : N.

Im fünften Versuch schließlich beobachten wir von Anfang an äußerst niedrige Zuckerwerte, mit Ausnahme des dritten Tages, und entsprechend niedrige Quotienten D : N.

Alle Hunde waren in sehr ähnlicher Weise vorbehandelt, allen war das Pankreas so vollständig wie möglich exstirpiert, und es erschien uns daher die auffallende Ähnlichkeit in der Zuckerausscheidung bei den ersten zwei Hunden eher erklärlich, als die auffällige Verschiedenheit dieses Faktors bei den späteren Versuchen.

Eine neuerlich veröffentlichte Untersuchung Lüthjes*) gibt uns aber nachträglich die Erklärung für unsere Beobachtungen. Lüthje fand, daß die Zuckerausscheidung pankreasdiabetischer Hunde in ausgesprochener Weise abhängig ist von der Außentemperatur, bei der sie gehalten werden. Mit dem Steigen der Außentemperatur sinkt, mit dem Sinken der Außentemperatur steigt die Zuckerausscheidung, und der Quotient D : N verhält sich dementsprechend.

Wie stimmen hiermit unsere Versuche überein? Die ersten beiden Hunde wurden im Sommer am gleichen Nachmittage operiert, und demzufolge unter gleichen Temperaturverhältnissen (im ungeheizten Zimmer) aufbewahrt. Es kann also nach den Untersuchungen Lüthjes nicht auffällig erscheinen, daß ihre Zuckerausscheidung so gleichmäßig verlief. (Worauf die Unterschiede während der späteren Versuchstage zurückzuführen sind, entzieht sich unserer Beurteilung.) Wir setzten unsere Ende Juli begonnene Versuchsreihe aus äußeren Gründen erst im November fort. Wir glaubten bis dahin die Erfahrung gemacht zu haben, daß sich pankreaslose Hunde am wohlsten fühlten und am längsten lebten bei sehr hohen Außentemperaturen, und wir brachten daher den Hund 3 in einen Laboratoriumsraum, der durch einen Gasofen tagsüber auf etwa 25° gehalten wurde. Auch während

*) Lüthje, Vortrag gehalten auf dem Kongreß für innere Medizin zu Wiesbaden 1905. Die nachfolgenden Ausführungen lehnen sich zum Teil an einige zu diesem Vortrage gemachte Diskussionsbemerkungen des einen von uns an.

der Nacht blieb der das Zimmer heizende Gasofen brennen. Bei diesem Hunde sanken Zuckerausscheidung und der Quotient D : N, ganz entsprechend den Angaben Lüthjes, rasch sehr stark ab.

Der um dieselbe Zeit operierte Hund 4 mußte in einem schlechter heizbaren Raume untergebracht werden. Genauere Angaben über die Temperatur, bei der er gehalten wurde, vermögen wir nicht zu machen, jedenfalls war sie weit niedriger als 25°. Daher die dauernd hohe Zuckerausscheidung und der hohe Quotient D : N.

Hund 5 kam wieder in den stark geheizten Raum und dementsprechend war die Zuckerausscheidung eine äußerst niedrige.

Das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, daß nämlich die nach Darreichung von Alanin an hungernde pankreaslose Hunde ausgeschiedenen Zuckermengen im Tierkörper aus Substanzen von nicht kohlehydratartiger Beschaffenheit neugebildet werden, wird durch die eben besprochenen Verhältnisse nicht berührt. Denn einerlei, ob die Außentemperatur, bei der die pankreaslosen Tiere gehalten werden, hoch oder niedrig, ob dementsprechend die Zuckerausscheidung geringfügig oder beträchtlich ist, das hungernde pankreaslose Tier enthält eine Woche nach der Operation (vielleicht schon früher) derartig geringe Mengen Glykogen, daß es praktisch ohne weiteres als nahezu glykogenfrei*) angesehen werden darf.

---

*) Dieses Verhalten entspricht ganz den Tatsachen, die schon v. Mering und Minkowski in ihrer ersten Mitteilung über den Pankreasdiabetes hervorhoben. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **26**, 379 (1890).

Kürzere Mitteilungen.

5. Zur künstlichen Umwandlung von Albumin in Globulin.

Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität Prag.

Von Dr. **Leopold Moll**, Assistenten.

In meiner Arbeit gleichen Titels [in diesen Beiträgen **4**, 563 (1904)], habe ich die Tatsachen besprochen, die für die Identität des natürlichen mit dem durch schwache Alkalieinwirkung aus Albumin erhältlichen Globulin sprechen: Salzfällungsgrenzen, Diffusibilität, Schwefelgehalt. Im Nachfolgenden seien zur Ergänzung die Befunde über die gesamtanalytische Zusammensetzung von kristallisiertem Albumin, dem aus diesem erzeugten künstlichen und einem nativen Pseudoglobulin nachgetragen.

Tabelle.

Präparat	C %	H %	N %	S %	O %	Bemerkung
I. Kristallisiertes Pferdeserum-albumin a. d. Jahre 1903	a) b) 51,92	7,00 7,23	16,00 (Dumas) 16,05 (Dumas)	2,18		Von mir dargestelltes Präparat. S-gehalt nach Waschen mit $NH_3 = 1,98$
II. Kristallisiertes Pferdeserum-albumin a. d. Jahre 1904	51,28	7,05	15,2 (Kjeldahl) 15,38 (Dumas)	2,33		Von Prof. Pohl dargestelltes Präparat. S-bestimmung ohne vorhergegangener Ammoniakextraktion nach Moerner (Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 244).
III. Künstliches Pseudoglobulin aus Präparat II	51,62	7,15	16,08 (Dumas)	1,24		
IV. Natürliches Pseudoglobulin desselben Serums wie II	52,38	6,80	15,47 (Dumas)	1,30		

Die Unterschiede zwischen künstlichem und natürlichem Globulin sind somit nicht größer als sie auch sonst für einen und denselben Eiweißkörper nachgewiesen werden: beide Körper sind somit identisch.

Belege:

Methoden: Die C- und H-bestimmung wurde im offenen Rohr mit chromsaurem Blei und Kupferspirale, die N-bestimmung volumetrisch,

die S-bestimmung nach den Angaben Moerners (Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 209) durchgeführt.

I. a)	0,2553 g	Substanz gibt	0,4860 CO_2 und 0,1594 H_2O
	0,2127 „	„ „	bei 21° C, Barometerst. = 748, 30,4 Cm N
	0,4356 „	„	(mit NH_3 gewaschen) gibt 0,0624 $BaSO_4$
b)	0,2394 „	„	gibt 0,1542 H_2O (CO_2 verunglückt)
	0,3008 „	„ „	bei 21°, B = 748, 43,1 Cm N.
II.	0,1990 „	„ „	0,3742 CO_2 und 0,1255 H_2O
	0,1996 „	„ „	bei 24°, B = 736, 28,3 Cm N.
	0,5866 „	„ „	0,0998 $BaSO_4$.
III.	0,1851 „	„ „	0,3510 CO_2 und 0,1184 H_2O
	0,2842 „	„ „	bei 21°, B = 745, 41,1 Cm N.
	0,5406 „	„ „	0,0476 $BaSO_4$.
IV.	0,2667 „	„ „	0,5122 CO_2 und 0,1619 H_2O.
	0,3474 „	„ „	bei 15°, B = 750, 46,5 Cm N.
	0,5405 „	„ „	0,0476 $BaSO_4$.

Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

VII. Band. 7., 8. u. 9. Heft

(Ausgegeben November 1905)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1905.

Inhalt des 7., 8. u. 9. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40.— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XVI.

Fütterungsversuche mit künstlicher Nahrung.

Von **W. Falta** und **C. T. Noeggerath.**

Aus der medizinischen Klinik zu Basel, Direktor Prof. W. His.

Daß der tierische Organismus mit Eiweiß, Fett, Kohlehydraten, Salzen und Wasser auf die Dauer auskommen könne, ist eine vielfach verbreitete Ansicht. Allerdings werden hierbei unter Eiweiß meist Muskelfleisch oder sonst eiweißreiches tierisches oder pflanzliches Gewebe verstanden. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Eiweißchemie ergab sich naturgemäß die Frage, ob dieser Satz auch bei Anwendung reiner Eiweißkörper in solchen Nahrungsgemischen zu Recht bestünde. Speziell in v. Bunges Laboratorium sind Arbeiten ausgeführt worden, welche wenigstens nebenher diese Frage behandeln. So fand Lunin*) im Jahre 1881, daß Mäuse mit einer solchen künstlichen Nahrung nicht leben könnten. Die von ihm verwendete Nahrung setzte sich zusammen 1. aus einem Koagulum, das durch Ausfällen von Milch mit Essigsäure und mehrfaches Auswaschen erhalten wurde und ungefähr zu gleichen Teilen aus Kasein und Fett bestand, 2. aus Rohrzucker und 3. aus einem Salzgemisch, das den durch v. Bunge bei seinen Analysen der Milchasche gefundenen Durchschnittszahlen möglichst genau entsprach. Auf 100 g Trockensubstanz kamen 4 g Salze. Die mit dieser Nahrung gefütterten Mäuse lebten 20 bis 31 Tage. Da die Tiere bis zum Tode fraßen und bei der Sektion fast immer Nahrungsreste im Digestionstraktus gefunden wurden, da ferner Mäuse mit getrockneter Milch allein beliebig lang am Leben erhalten werden können, so lehnt Lunin den Einwand ab, es möchte den Tieren die einförmige Nahrung auf die Dauer widerstanden haben, so daß sie gegen Ende des Versuches die Nahrungsaufnahme verweigert hätten und verhungert

---

*) N. Lunin, Über die Bedeutung der anorganischen Salze für die Ernährung des Tieres. Zeitschr. f. physiol. Chemie 5 (1881).

wären. Lunin glaubt vielmehr hauptsächlich in zwei Momenten die Todesursache suchen zu müssen. Einmal könnten in der Milch neben den in der künstlichen Nahrung vorhandenen noch andre für die Ernährung unbedingt notwendige Stoffe vorhanden sein [Lunin denkt dabei in erster Linie an organische Phosphorverbindungen (z. B. an die Lecithine)], andrerseits könnte durch die mit der Gewinnung des Kaseins verbundenen Manipulationen die normale Verbindung zwischen den anorganischen und organischen Bestandteilen der Milch zerstört worden sein.

Später ist von Socin*) in einer Arbeit über die Resorbierbarkeit organischer Eisenpräparate diese Frage in v. Bunges Laboratorium noch einmal aufgenommen worden. Die zu diesen Versuchen verwendete Nahrung ist eigentlich nicht mehr im strengen Sinn des Wortes eine künstliche zu nennen. Zu 100 g Pferdeblutserum (enthaltend 8,5 g Eiweiß) wurden hinzugefügt 6 g Fett, 20 g Stärke, 3 g Traubenzucker, 2 g Zellulose und etwa 2 g Salze (in Form der schon von Lunin gebrauchten Salzmischung). In zwei weiteren Versuchsreihen enthielt die sonst völlig eisenfreie Nahrung außerdem noch Hämoglobin bzw. Hämatogen und zwar so viel, daß auf 100 g des getrockneten Nahrungsgemisches entsprechend dem Eisengehalt des Eidotters 0,01 g Eisen kam. Die Mäuse lebten in allen Versuchsreihen ungefähr gleich lang, nämlich nur 20 bis 32 Tage, während Mäuse, die mit gekochtem Eidotter unter gewissen Kautelen (Zellulosedarreichung) gefüttert worden waren, über 100 Tage lebten und an Körpergewicht zunahmen. Neben den von Lunin diskutierten Erklärungsversuchen faßt Socin noch die Möglichkeit ins Auge, daß die einzelnen Eiweißkörper sich gegenseitig nicht völlig in der Nahrung vertreten könnten.

Wie weit tierische Gewebe durch Verdauungsfermente gespalten werden können, ohne ihre Verwertbarkeit für die Eiweißsynthese im Tierkörper zu verlieren, ist in neuerer Zeit häufig der Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Wir verweisen hier nur auf die Versuche von O. Loewi**), welcher mit abiureten Verdauungsgemischen von Pankreasgewebe Hunde durch mehr als einen Monat im N-Gleichgewicht erhalten konnte. Ob aber Tiere mit einer Nahrung dauernd leben können, die nur solche Bestandteile enthält, welche chemisch hinlänglich

*) C. H. Socin, In welcher Form wird Eisen resorbiert? Zeitschr. f. physiol. Chemie 15 (1891).

**) O. Loewi, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 48, 1902.

charakterisiert sind, diese Frage finden wir außer in v. Bunges Lehrbuch der Physiologie nirgends ausführlicher diskutiert. Doch müssen wir auf eine Anzahl von allerdings unter anderen Gesichtspunkten angestellten Versuchen hinweisen, weil das von uns verfolgte Problem darin schon gelöst zu sein scheint.

In Zadiks*) Arbeit sollte der Nährwert phosphorfreier und phosphorhaltiger Eiweißkörper festgestellt werden. Zu diesem Zwecke wurde ein Hund mit einer künstlichen Nahrung gefüttert, die Salze, Fett, Kohlehydrate und abwechselnd Edestin bzw. Kasein oder Vitellin enthielt. Es wurde die N- und P-Bilanz genau bestimmt. Die erste 22tägige Versuchsperiode Zadiks ist für uns nicht verwertbar, da 2 Tage mit Fütterung von Fleisch und Hundekuchen eingeschaltet waren. Die zweite Versuchsperiode erstreckt sich auf 31 Tage. Es wurde in derselben 5,03 g N und 0,84 g P angesetzt. Die ersten 12 Tage dieser Periode sind allerdings für uns wiederum nicht verwertbar, da noch Fleischextrakt der Nahrung zugefügt war. Es bleiben also nur 19 Tage, innerhalb welcher das Tier mit künstlicher Nahrung in für unsere Fragestellung einwandsfreier Weise ernährt worden war und dabei P und N ansetzte.

Nach Abschluß unserer eigenen Versuche erschienen ferner noch zwei Arbeiten von Abderhalden und Rona**) sowie die Arbeit von Henriques und Hansen***). In der ersten Arbeit der erstgenannten Autoren finden sich Versuche, in denen Mäuse mit Kasein und Rohrzucker ernährt wurden, und mit dieser Nahrung ebensolang lebten wie die Luninschen Versuchstiere.

Diese Versuche bilden also nach dieser Richtung hin eine Bestätigung der Luninschen Versuche. In ihrer zweiten Arbeit ist ein Versuch angeführt, in welchem ein Hund 14 Tage lang mit pankreasverdautem Kasein, Schweineschmalz und Stärke gefüttert wurde. Er retinierte in dieser Zeit 3,01 g N; sein Körpergewicht stieg von 2,825 auf 3,01 kg.

Wichtiger sind für uns die Versuche von Henriques und Hansen, in welchen weiße Ratten mit Kasein, Fett, Kohlehydraten und Salzen 3 bis 4 Wochen lang ernährt wurden. Sie

*) H. Zadik, Stoffwechselversuch mit phosphorhaltigen und phosphorfreien Eiweißkörpern. Archiv f. d. ges. Physiol. **77**, 1899.

) E. Abderhalden und P. Rona, Fütterungsversuche mit durch Pankreatin usw. hydrolisiertem Kasein. Zeitschr. f. physiol. Chemie **42, 1904 und: Über die Bedeutung der Abbauprodukte des Kaseins im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **44**, 1905.

***) Henriques und Hansen, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 1904/05.

nahmen dabei an Körpergewicht etwas zu und retinierten dabei auch N. Man könnte versucht sein, das gesamte besprochene Material so zu deuten, daß die Ernährung mit künstlicher Nahrung bei Mäusen nur deshalb nicht geglückt sei, weil Mäuse für solche Versuche ungeeignet sind, daß aber dies uns interessierende Problem für Hunde und Ratten in bejahendem Sinne entschieden sei. Aus den folgenden eigenen Versuchen geht aber hervor, daß dies tatsächlich nicht der Fall ist.

Methodik. Als Versuchstiere dienten uns weiße ausgewachsene meist männliche Ratten.

Sie wurden im Laboratorium einzeln in weithalsigen 10 Literflaschen gehalten, die nach Absprengung des Bodens mit dem Hals nach unten in einem Gestell aufgehängt waren. Als Boden dieses Käfigs diente ein weitmaschiges Drahtnetz, das auf dem sich verjüngenden Teil der Flasche ruhte, so daß der Harn in eine untergestellte Schale abfloß. Nach oben wurde der Käfig durch ein beschwertes Fliegennetz abgeschlossen. Futter und Wasser, die in getrennten Schalen sich befanden, wurden alle 24 Stunden erneuert, ebenso die Holzwolle, auf welcher die Tiere der Wärme und Reinlichkeit wegen in den täglich gereinigten Käfigen lebten. Gewogen wurden die Tiere in hohen Glaszylindern.

In den Nahrungsgemischen wurden verwendet:

1. Eiweißkörper: Ovalbumin. puriss. pulv., Casein. puriss. (nach Hammarsten), Albumin aus Blut, Fibrin. pulv. aus Blut, Hämoglobin (sämtlich von Merck bezogen), Blutglobulin.*)

2. Fett: anfänglich ausgelassenes und mehrmals in Äther umgelöstes Schweinespeckfett, später nur gereinigtes, amerikanisches Schweineschmalz.

3. Kohlehydrate: Amylum und Traubenzucker (beides von Merck).

4. Salze: Es wurde verwendet eine Schüttelmixtur, bestehend aus:

a)	einem Salzgemisch (Kal. carbonic. 17,6 g, Calc. phosphor. 28,6 g, Calc. carbonic. 10,0 g, Magnes. chloric. 3,8 g)	60 g
b)	Milchsalze (durch vorsichtiges Veraschen von Milch gewonnen)	40 g
c)	Pferdeblutserumsalze	20 g
		120 g

20 ccm der Schüttelmixtur entsprachen 5 g Salzen.

5. in der Versuchsreihe IV wurden außerdem verwendet: Nucleinsaures Natrium (Boehringer), Cholesterin (Merck) und

---

*) Das Blutglobulin wurde uns von den Höchster Farbwerken freundlichst zur Verfügung gestellt, wofür wir bestens danken.

über Schwefelsäure getrocknetes, fein pulverisiertes Lecithin (dargestellt nach Bergell).

Über die genaue Zusammensetzung der Nahrung siehe die einzelnen Versuche.

Aus diesen Bestandteilen wurden nun die Nahrungsgemische in folgender Weise hergestellt:

Die pulverförmigen Nahrungsmittel wurden zuerst in einer Reibschale trocken mit dem Pistill gut vermischt. Dann wurde die Salzmischung und das unter Erwärmen verflüssigte Fett unter stetem Verreiben hinzugefügt und schließlich so viel Wasser zugegossen, daß ein gut knetbarer Teig entstand, der im Eisschrank aufbewahrt wurde. Hiervon wurde den Tieren täglich eine mehr als ausreichende Menge vorgesetzt; ein solcher Teig reichte für 2 Tiere gewöhnlich 2 bis 3 Wochen lang.

Versuche.

Die Ergebnisse der in den drei ersten Reihen mit je 2 Ratten, in der vierten Reihe mit 4 Ratten angestellten Versuche sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Es sei gleich erwähnt, daß die Tiere die ihnen dargebotene Nahrung offenbar gern nahmen; nur wenige Tage vor dem Tode wurde die Freßlust auffallend geringer; eine Ausnahme machten allerdings die Tiere in den Serumalbuminversuchen, da sie von Anfang an weniger fraßen. Bei sämtlichen Tieren wurde in regelmäßigen Entleerungen ein geformter Kot abgesetzt. Diarrhoen haben wir nicht beobachtet. Die verendeten Tiere wurden möglichst bald seziert. Im Magen und Darm wurden dabei regelmäßig Nahrungsreste gefunden. Die Tiere zeigten außer hochgradigem Schwund des Fettpolsters, falls dies nicht ausdrücklich bemerkt ist (cfr. Versuch II u. III), keine makroskopisch wahrnehmbaren pathologischen Veränderungen. Besonders haben wir auf etwaige Darmobstruktionen geachtet, diese aber niemals beobachtet.*) Mangel an Cellulose läßt sich also schon hierdurch als Todesursache ausschließen, ebenso interkurrente Krankheiten. Letztere nur vielleicht nicht für Versuch III.

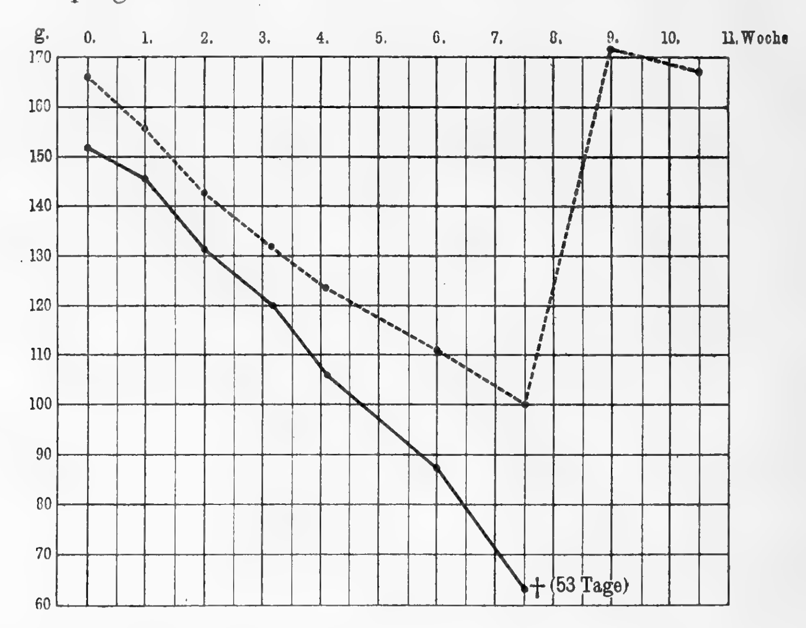
I. Versuche mit Serumalbumin.

Zusammensetzung der Nahrung: Serumalbumin 120 g, Fett 60 g, Amylum 250 g, Dextrose 50 g, Salze 5 g.

---

*) Ihr Auftreten beobachtete Socin infolge Mangels an Cellulose und des dadurch fehlenden Reizes für die Peristaltik. Bei ausschließlicher Ernährung mit hartgekochtem Eidotter haben wir überdies, ganz ähnlich wie Socin Mäuse, auch Ratten nach 4wöchentlichem Gedeihen plötzlich eingehen sehen. Die Sektion ergab, daß bei beiden Tieren das untere Ende des Duodenum bis auf das 6fache seines Durchmessers spindelförmig aufgetrieben und mit harten unverdauten gelben Massen gefüllt war.

g = Körpergewicht.



Ratte 1 (ausgezogene Linie):

Beginn des Versuches am 9. IV. 03; † 1. VI. 03.

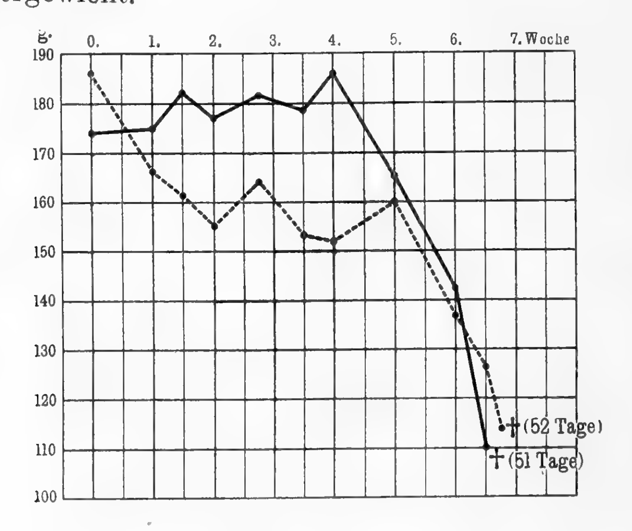
Ratte 2 (gestrichelte Linie):

Beginn des Versuches am 9. IV. 03; vom 1. VI. an wird das Tier mit Fleisch und Milch ernährt, schon am 11. VI. hat es sein Anfangsgewicht wieder erreicht und hält sich dann bis zum Abbruch des Versuches (22. VI.) auf dieser Höhe.

II. Versuche mit Kasein.

Zusammensetzung der Nahrung: Kasein 120 g, Fett 60 g, Amylum 250 g, Dextrose 50 g, Salze 5 g.

g = Körpergewicht.



Ratte I (ausgezogene Linie):

Beginn des Versuches 9. I. 03; † 1. III. 03.

Ratte II (gestrichelte Linie):

Beginn des Versuches 9. I. 03; † 2. III. 03.

Im Beginn der IV. Woche entwickelte sich bei beiden Tieren eine Conjunctivitis mit Borkenbildung, die bis zum Tode bestand. Natürlich waren auch diese Tiere getrennt gehalten. Sie wurden überdies wie die Tiere der Versuchsreihe III vom Beginn der Erkrankung ab in eigenen Wägegläsern gewogen. Vom Anfang der VI. Woche ab fraßen die Tiere bedeutend weniger.

III. Versuche mit Ovalbumin.

Zusammensetzung der Nahrung: Ovalbumin 120 g, Fett 60 g, Amylum 250 g, Dextrose 50 g, Salze 5 g.

g = Körpergewicht.



Ratte I (ausgezogene Linie):
Beginn des Versuches 30. I. 03; † 4. V. 03.
Ratte II (gestrichelte Linie):
Beginn des Versuches 30. I. 03; † 23. IV. 03.

Im Laufe der III. Woche bei beiden getrennt gehaltenen Tieren Conjunctivitis, später Panophthalmie, und anschließend daran Abszeßbildung in der Kiefer- und Halsgegend. Beide fraßen bis zum Tode reichlich. Die Sektion ergab außer den erwähnten Abszessen eine leicht vergrößerte und weichere Milz bei Ratte II.

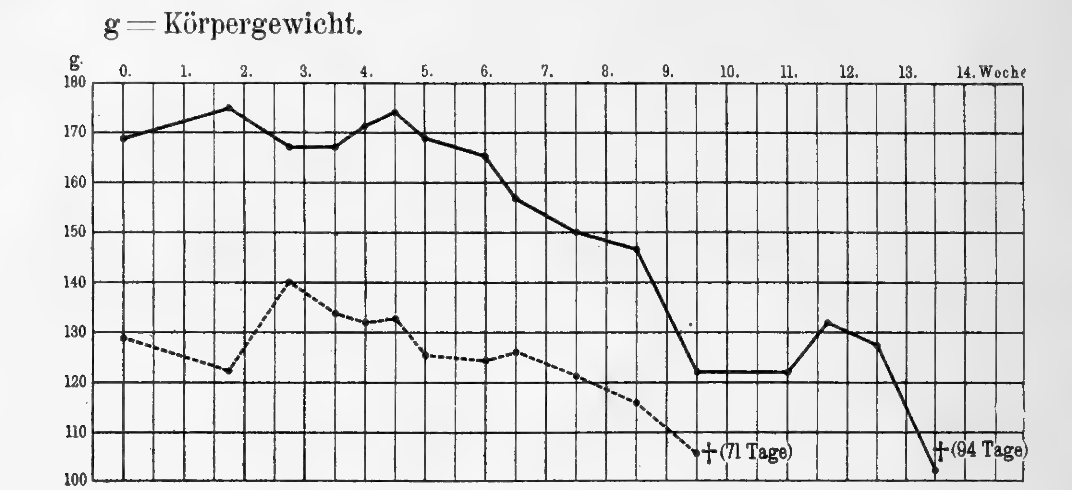
Colon und Magen waren reichlich mit Speiseresten gefüllt.

IV. Versuche mit kombinierter Nahrung.

Zusammensetzung der Nahrung: Eiweißkörper 120 g [Ovalbumin 30 g, Kasein 30 g, Blutglobulin 10 g, Albumin 20 g, Fibrin 20 g, Hämoglobin 10 g*)], nukleinsaures Natrium 10 g, Cholesterin 2,5 g, Lecithin 3 g, Fett 60 g, Amylum 250 g, Dextrose 50 g, Salze 5 g

*) Das Hämoglobin wurde erst vom 10. I. an, als ein neuer Teig bereitet wurde, zugefügt; vorher enthielt der Teig 20 g Blutglobulin.

g = Körpergewicht.



Ratte I (ausgezogene Linie):
Beginn des Versuches 23. XII. 02; † 27. III. 03.
Ratte II (gestrichelte Linie):
Beginn des Versuches 23. XII. 02; † 4. III. 03.

Ratte II warf am 3. I. kurz vor der II. Wägung 5 nicht ausgetragene Junge (zusammen 7 g). Beide Tiere fraßen bis zum Tode gut. Bei der Sektion waren Magen und Darm gefüllt; sonst o. B.

Bei zwei weiteren Ratten von 186 und 170 g Körpergewicht wurde ein ähnlicher Versuch gemacht, nur enthielt hier das Nahrungsgemisch mehr Lecithin und Cholesterin (nämlich 18 g Lecithin und 9 g Cholesterin). Da die Körpergewichtskurven ganz gleich verliefen, brachen wir die Versuche nach 8 Wochen ab.

Aus diesen Versuchen ergibt sich folgendes:

1. Mit keinem der hier verwendeten Nahrungsgemische konnten die Tiere dauernd am Leben erhalten werden. Es gilt dies sowohl für die Nahrungsgemische mit nur einem Eiweißkörper, wie auch für die mit mehreren Eiweißkörpern, denen übrigens noch Lecithin, nucleinsaueres Natrium und Cholesterin zugesetzt waren. Wir wollen hier noch bemerken, daß wir uns davon überzeugt haben, daß Ratten unter sonst gleichen Bedingungen mit Kuhmilch oder Milchpulver oder magerem Pferdefleisch beliebig lang (6 Monate) gut ernährt werden können, ohne an Körpergewicht abzunehmen.

2. In den Versuchsreihen verlaufen die Körpergewichtskurven beider Tiere nahezu parallel.*)

*) Aus diesem Parallelismus der Kurven in den einzelnen Versuchen ergibt sich zweifellos, daß Ratten für solche Untersuchungen geeigneter sind als Mäuse. Denn wir sehen bei den Experimenten von Lunin und denen von Socin die einzelnen mit gleicher Nahrung gefütterten Mäuse

3. In jeder Versuchsreihe weisen die Körpergewichtskurven einen gewissen Typus auf: Die Serumalbuminkurven fallen von Anfang an rapid ab, die Kaseinkurven verlaufen anfangs horizontal oder steigen etwas an, um erst mit Beginn der IV. bzw. V. Woche rapid abzufallen, die Ovalbuminkurven und die Kurven der Versuche mit kombinierter Nahrung zeigen im allgemeinen einen gestreckteren Verlauf, sie steigen zuerst ein wenig an, um dann eine Zeitlang allmählich und erst unmittelbar vor dem Tode der Versuchstiere steiler abzufallen.*)

4. Die Serumalbuminratten und die Kaseinratten starben trotz ihres anfänglich verschiedenen Verhaltens ungefähr gleich rasch (53 Tage bzw. 51 und 52 Tage). Bedeutend länger lebten die Ovalbuminratten (83 und 94 Tage) und die mit kombinierter Nahrung gefütterten Ratten (71? und 94 Tage). Aus Versuch I bis III ergibt sich, daß die ceteris paribus verfütterten Eiweißkörper sich hier biologisch nicht gleichwertig verhalten.

5. Bei ihrem Tode hatten die Versuchstiere nur noch die Hälfte bis $^2/_3$ ihres Anfangsgewichtes, nur die Serumalbumintiere waren noch leichter ($^2/_5$ des Anfangsgewichtes).

Wir sind uns wohl bewußt, daß diese Versuche rein orientierenden Charakter haben. Denn der Grund, weshalb mit einer derartigen künstlichen Nahrung gefütterte Tiere nicht dauernd am Leben erhalten werden können, läßt sich unseres Erachtens weder aus unseren noch aus den eingangs zitierten Versuchen ersehen. Wir haben aber geglaubt, sie veröffentlichen zu sollen, weil es, wie vorne bemerkt, den Anschein haben könnte, als ob in den erwähnten Arbeiten von Zadik, Abderhalden und Rona sowie Henriques und Hansen das uns hier interessierende Problem gelöst sei. Denn aus diesen — übrigens unter ganz anderen Gesichtspunkten angestellten — Versuchen geht hervor, daß Hunde und Ratten bei einer derartigen Nahrung leben und sogar Phosphor und Stickstoff ansetzen können.

Unsere Versuche zeigen nun aber, daß eine solche Nahrung auf die Dauer nicht ausreicht. Dies läßt sich ganz besonders deutlich durch Vergleichung unserer Kaseinversuche mit den

---

in immerhin größeren Zeiträumen (20 bis 31 Tage) sterben. Das Intervall, das zwischen dem Verscheiden des ersten und letzten Tieres liegt, beträgt dort oft die Hälfte der ganzen Versuchsdauer.

*) Eine Ausnahme macht nur Ratte II in Versuch IV. Hier erfolgte der Tod schon relativ früh. Dies darf vielleicht auf eine Schwächung durch die erwähnte Frühgeburt bezogen werden.

von Henriques und Hansen unter ganz ähnlichen Bedingungen an Ratten angestellten Kaseinversuchen zeigen. Die Dauer ihrer entsprechenden Versuche belief sich ja auf höchstens 3 bis 4 Wochen. In dieser Zeit verhalten sich die Körpergewichtskurven ihrer und unserer Ratten vollkommen gleich. Erst dann erfolgte bei unseren Versuchen der rapide Körpergewichtsabfall; erst jetzt dokumentiert sich also die Unzulänglichkeit der Nahrung.

Ob in der Periode des Gewichtsabfalles in unseren Versuchen die Tiere genügend Nahrung aufgenommen haben, um ihr Kalorienbedürfnis zu decken, können wir nicht sicher angeben. Der Befund von Nahrungsresten im Digestionstraktus der toten Tiere (Lunin) ist unseres Erachtens hierfür kein zwingender Beweis. Hier müßten genaue Stoffwechselversuche mit Berücksichtigung der Kraftbilanz einsetzen. Erst wenn der Einwand ungenügender Nahrungsaufnahme oder ungenügender Ausnutzung, für welche beiden Momente man vielleicht die Einförmigkeit der Kost und den Mangel an Gewürzen verantwortlich machen könnte, beseitigt ist, wären andere Gründe zu erörtern, wie z. B. der Mangel der nötigen chemischen Bausteine oder ein abweichendes chemisches Gefüge der eingeführten Nährstoffe.

Unserm verehrten Chef, Herrn Professor W. His danken wir für das Interesse und die Förderung, welche er dieser Arbeit zukommen ließ.

XVII.

Über die morphogenetische Reaktion des Darmkanals der Froschlarve auf Muskelproteine verschiedener Tierklassen.

Von Privat-Dozent Dr. **Edward Babák**, Assistent des Institutes.

Aus dem k. k. physiologischen Institut der böhmischen Universität in Prag.

Meine Untersuchungen über den Einfluß der Nahrung auf die Länge des Darmkanals[1]) führten mich zu dem experimentellen Nachweis, daß das Verdauungsrohr der Froschlarve bei Pflanzenkost weit bedeutender in die Länge wächst als bei Fleischkost; das in der ersten Arbeit gefundene Verhältnis der Darmlänge der mit Fleisch gefütterten zu derjenigen mit Pflanzenkost ernährter Kaulquappen (in den Zahlen ausgedrückt, welche angeben, wie vielmal die Körperlänge in der Darmlänge enthalten ist) beträgt 4,4 : 7,0. Die in den weiteren Versuchsreihen gefundenen Zahlen sind[2]) 6,0 : 8,6.

Bei der annähernden Vergleichung der kubischen Inhalte sowie der sezernierenden und resorbierenden Oberflächen der Därme ergab sich, daß auf die Einheit der inneren Darmfläche bei den fleischfressenden Larven ungefähr ein zweimal größerer Inhalt kam, als bei den pflanzenfressenden. Dies Ergebnis ist vom teleologischen Standpunkte leicht begreiflich, da die Pflanzenkost wegen ihrer geringen Ausgiebigkeit eine größere Verdauungsfläche erfordert.

In der Verfolgung der kausalen Analyse dieser zweckmäßigen Gestaltungsreaktion des Darmkanals gelang es mir festzustellen, daß die Verlängerung nicht so sehr durch den mechanischen Reiz der Pflanzenkost bedingt ist, als vielmehr durch die chemische Einwirkung derselben. Indem ich dem Froschfleische, womit ich die Kaulquappen fütterte, eine in bezug auf Volum unbedeutende Menge von zerriebenem Keratin zu-

gab, erzielte ich eine auffallende Verlängerung des Darmkanals: 7,0 gegen 6,0 bei den mit reinem Froschfleisch gefütterten Tieren.

Die Fütterung mit Pflanzenproteinen (Pflanzenproteinsubstanz von Grübler & Co., Leipzig, aus Kürbissamen dargestellt, mit etwa 45 Proz. leicht löslichen Vitellins) führte zu einer noch größeren Verlängerung: 7,2 (gegen 6,0 bei den mit reinem Froschfleisch gefütterten). —

Auf Grund dieser Ergebnisse unternahm ich in diesem Jahre einige Versuchsreihen, die den Zweck hatten festzustellen, ob etwa Verschiedenheiten in der Entwicklung des Darmkanals durch verschiedene Muskeleiweißkörper hervorgerufen werden könnten. Die Untersuchungen führten mich zu positiven Resultaten, über die ich nun in aller Kürze berichten will.

Als Versuchstiere dienten Kaulquappen von Rana temporaria, welche ich aus Eiern in unserem Institute gezüchtet hatte. Über tausend Exemplare, von sechs Weibchen herstammend, wurden gemengt und dann in sechs annähernd gleiche Abteilungen gesondert. Sobald sie anfingen Nahrung von außen zu sich zu nehmen, wurde ihnen verschiedenes Fleisch in fein zerriebener Form dargereicht und zwar:

Wirbeltierfleisch:
- A. reines Froschfleisch (von frisch getöteten Tieren),
- B. „ Fischfleisch (von frisch getöteten Tieren; die Species Rhodeus amarus wurde fortwährend in einem großen Aquarium in Vorrat gehalten),
- C. reines Pferdefleisch (möglichst frisch gekauft),

Fleisch von Wirbellosen:
- D. reines Muschelfleisch (von frisch getöteten Muscheln [Anodonta]; die Schließmuskeln und der Rand des Fußes),
- E. reines Krebsfleisch (von frisch getöteten Flußkrebsen, die Abdominal- und Scherenmuskulatur),

Pflanzenproteine:
- F. Proteinsubstanz aus Pflanzen (von Grübler & Co., aus Kürbissamen dargestellt; mit Stückchen Froschfleisch fein zerrieben).

Alle sechs gleich große Aquarien schöpften gleiche Mengen von Wasser aus einem großen Reservoir, in welchem das Leitungswasser fortwährend zirkulierte; durch passende Vorrichtung wurde aus allen Aquarien fortwährend Wasser abgeführt, sodaß das Niveau in allen stets gleich hoch blieb. Die Nahrung ausgenommen standen also alle sechs Aquarien unter durchwegs gleichen Verhältnissen. Die Nahrung wurde dargereicht zuerst jeden zweiten Tag, später täglich in solcher Menge, daß es zu keiner weitgehenden Zer-

setzung kam, womöglich soviel, als die Tiere während der Zeit zu sich nehmen konnten. Die Exkremente wurden möglichst oft, mindestens einmal täglich sorgfältig entfernt, und die Gefäßwände rein gehalten. Es kam daher nicht zur Entwicklung einer störenden Fauna oder Flora, wie sie sonst leicht in langsam fließendem Wasser üppig aufkommt.

Das Gedeihen sämtlicher Versuchstiere war gut. Die hin und wieder gestorbenen Exemplare wurden sogleich beseitigt.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien zeigen verschiedene Körperlänge; da diese in Korrelation mit der Darmlänge steht, mußte auf dieses Verhältnis Rücksicht genommen werden; es wurden also Tiere verschiedener Entwicklungsstadien in schwacher Formaldehydlösung betäubt und dann sogleich die Darmlänge sowie die Körperlänge gemessen.

Die Übersicht der Ergebnisse ist in der beigelegten Tabelle I dargestellt; die Zahlen bedeuten die Darmlänge in Körperlängen ausgedrückt (Durchschnittswerte).

Tabelle I.

Die Bezeichnung der Versuchstiere	Die Körperlänge der nacheinander folgenden Entwicklungsstadien			
	bis 10,5 mm	bis 11,5 mm	bis 12,5 mm	bis 14,5 mm
A. (Froschfleisch):	5,9	6,8	7,1	7,2
B. (Fischfleisch):	5,7	6,6	6,9	7,6
C. (Pferdefleisch):	6,0	6,5	6,6	7,0
Durchschnittswerte aller mit Wirbeltierfleisch gefütterten Tiere:	5,9	6,6	6,9	7,3
D. (Muschelfleisch):	5,3	6,1	6,0	6,1
E. (Krebsfleisch):	6,3	7,4	7,9	8,2
F. (Proteinsubstanz aus Pflanzen):	6,7	7,6	8,6	8,9

Werden in jeder Abteilung die gesamten Darmlängen zusammengerechnet und durch die ganze Anzahl der Kaulquappen des Aquariums geteilt, so erhalten wir die großen Durchschnittswerte, wie sie in der Tabelle II verzeichnet sind.

Tabelle II.

Die Bezeichnung der Versuchstiere	Die Zahl der Tiere, welche zu der Durchschnittszahl herangezogen wurden	Durchschnittliche Darmlänge in Körperlängen ausgedrückt
A. (Froschfleisch):	188	6,6
B. (Fischfleisch):	201	6,6
C. (Pferdefleisch):	89	6,6
D. (Muschelfleisch):	193	5,9
E. (Krebsfleisch):	185	7,6
F. (Pflanzenproteine):	132	8,3

Die drei mit Wirbeltierfleisch gefütterten Aquarien weisen also nur wenig abweichende Zahlen für die Darmlänge bei den einzelnen Entwicklungsstadien auf; die großen Durchschnittswerte sind sogar vollkommen gleich: 6,6 Körperlängen.

Die mit Fleisch von Wirbellosen und mit Pflanzenproteinen gefütterten Tiere aber weichen stark davon ab. Und zwar entwickelt sich der Darm bei den mit Muschelfleisch gefütterten Froschlarven weit weniger in die Länge als bei den mit Wirbeltierfleisch ernährten Tieren: höchstens auf 6,1 Körperlängen, im großen Durchschnitte sogar nur 5,9. Dagegen wächst bei den mit Krebsfleisch ernährten der Darmkanal bedeutend in die Länge, bis auf 8,2 Körperlängen, im großen Durchschnitte auf 7,6; allerdings immer noch weniger als bei den mit Pflanzenproteinen gefütterten (bis 8,9, im Durchschnitte 8,3 Körperlängen). —

Die angeführten morphogenetischen Unterschiede in der Entwicklung des Darmkanals der Froschlarven je nach der Herkunft der Nahrung kann man wohl als zweckmäßige Reaktionen des Organismus auffassen (Anpassungserscheinungen). Und zwar kann man dafürhalten, daß es sich um die chemischen Reizwirkungen der Proteine handelt. Denn mechanische Einwirkungen, welche ich in meiner früheren experimentellen Untersuchung[2]) möglichst hoch getrieben habe (sowohl die Druckwirkung, als auch die Reibung), führten nur zu kleinen Unterschieden der Darmlängen, wogegen die Pflanzenproteine und Keratin auffällige Verlängerung des Darmkanals bewirkten.

Mit großer Wahrscheinlichkeit kann ich nun andere chemische Reize als diejenigen der Eiweißkörper ausschließen. Die Unterschiede in dem Gehalte an Salzen z. B., wie sie angegeben werden, sind bei den benutzten Nahrungsstoffen zu klein, um die auffälligen Unterschiede der Darmlängen bewirken zu können. Die älteren Versuche[2]) mit übermäßiger Darreichung der in Pflanzenkost vorkommenden Salze bürgen dafür, daß man kaum mit ihrer Einwirkung rechnen kann.

Die neueren Untersuchungen über die chemischen Unterschiede zwischen den Eiweißkörpern verschiedener Muskeln unterstützen vollkommen meine Behauptung. von Fürth[3]) hat in den Muskeln von Oktopoden, Sepien und Holothurien kein typisches Myosin (Koagulationstemperatur unter 50°) gefunden. Nach den weiteren Forschungen desselben Autors, sowie nach den systematischen Untersuchungen H. Przibrams an zahlreichen Vertretern verschiedener Tierklassen[4]) ist bei den Wirbellosen auch kein typisches Myogen vorhanden; ebensowenig konnte das im Muskelplasma gewisser Wirbeltiere präformierte lösliche Myogenfibrin mit Sicherheit bei irgendwelchem wirbellosen Tiere nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen der chemischen Forschung, welche einen bedeutenden Unterschied in den Eiweißkörpern der Wirbeltiere und der Wirbellosen klarlegen, zeigen unsere Messungen der Darmlänge bei den mit Fleisch von Wirbeltieren und Wirbellosen gefütterten Kaulquappen große Abweichungen.

Es läßt sich auf Grund unserer morphogenetischen Reaktion behaupten, daß zwischen den Muskeleiweißkörpern der einzelnen Wirbellosentypen weit größere chemische Differenzen vorkommen werden, als zwischen den einzelnen Wirbeltierklassen sichergestellt worden sind. Wir möchten deshalb die Aufmerksamkeit der chemischen Spezialforscher besonders auf die Eiweißkörper der Anodontamuskeln und der Krebsmuskeln lenken.

Betreffs der Unterschiede der Eiweißkörper in der Muskelsubstanz der Wirbeltiere gibt v. Fürth[3]) an, daß das lösliche Myogenfibrin sich bei Karpfen und Frosch bereits in vivo vorhanden zeigt, beim Kaninchen erst später auftritt (am nächsten Tage sich aus dem Myogen bildet); das Myoproteid (nach Auskochung der Eiweißlösung bei Zusatz von Essigsäure erst bei hoher Azidität ausfallend) wurde mit Sicherheit nur beim Karpfen erhalten, während das Plasma des Frosches nach analoger Behandlung

eine schwache Trübung erkennen ließ, das Kaninchenplasma eiweißfrei war. Przibram[4]) fand diesen Eiweißkörper von Ammocoetes zu den Teleostiern in steigender Menge, wogegen er bei den Amphibien nur in Spuren nachweisbar war, bei den Amnioten überhaupt fehlte. — In Übereinstimmung mit diesen kleinen Unterschieden in der chemischen Natur des Muskelplasmas der einzelnen Wirbeltierklassen zeigen unsere Ergebnisse keinen auffälligen Unterschied in der Darmlänge der mit Fisch-, Frosch- und Pferdefleisch ernährten Froschlarven.

Über den Mechanismus, durch welchen die beschriebene zweckmäßige morphogenetische Reizreaktion des Darmkanals der Froschlarven vermittelt wird, kann man nur Vermutungen hegen, welche allerdings durch manche Erfahrungen unterstützt werden. Die größte Darmlänge kommt zustande bei den mit Pflanzenproteinsubstanz ernährten Tieren. Es wurde durch eine Reihe von Forschern bewiesen, daß die vegetabilischen Eiweißkörper aus Gründen, die wir noch nicht kennen, weniger leicht verdaulich sind, als die animalischen (Prausnitz, Rutgers, Rubner, Halliburton usw.). Was die chemischen Untersuchungen betrifft, findet man einige Angaben über die quantitativen Verhältnisse der Zersetzungsprodukte der tierischen und pflanzlichen Eiweißkörper [Hofmeister[5]), Jolles[6]); qualitative Verschiedenheit einiger pflanzlichen Eiweißkörper gegenüber den tierischen — das Fehlen von Lysin bei ihrer Spaltung — betonen Schulze und Winterstein[7]) usw.).

Es könnten also bei der fortschreitenden Spaltung der verschiedenen Eiweißkörper in dem Verdauungskanal quantitative und qualitative Verschiedenheiten der Zersetzungsprodukte zustande kommen, wodurch die Darmwand verschiedenartig beeinflußt werden könnte.

Ein anderer Gedanke wird durch Pawlows[8]) Angabe nahegelegt, daß auf Brotzufuhr im Magen ein viel stärkerer Saft sezerniert wird, als nach Fleisch. Pawlow hat drei Möglichkeiten diese Erscheinung zu erklären hervorgehoben: es könnten die physikalischen Eigenschaften der Speise oder die spezielle Natur der Eiweißkörper des Brotes und des Fleisches, oder endlich im Brot die Verquickung des Eiweißes mit Stärke von Bedeutung sein. Nach der Ausschließung der ersten Voraussetzung wurde die dritte experimentell glänzend bestätigt, was den Autor „der Notwendigkeit enthob, die zweite besonders zu prüfen“. Nichtsdestoweniger kann auch die zweite

Möglichkeit zu Recht bestehen, und es wäre erwünscht, wenn man sie experimentell prüfen würde. Würden die pflanzlichen Eiweißkörper reflektorisch größere Sekretion oder Sekretion von stärkerem Saft hervorrufen, so könnte man sich einigermaßen auch die Möglichkeit vorstellen, daß sie auch die Wachstumsverhältnisse der Darmwand beeinflussen können; es besteht gewiß eine intime Beziehung zwischen der sekretorischen Tätigkeit und den übrigen Lebensvorgängen der Zellen.

Die soeben kurz mitgeteilten Versuchsreihen unternahm ich auf Grund einer anderen Hypothese. Der Vergleich zwischen den einverleibten Eiweißkörpern sowie ihren Spaltungsprodukten im Darmkanal einerseits und den im Blute vorkommenden Eiweißkörpern andererseits zwingt zu dem Schlusse, daß die Darmwand aus den resorbierten Eiweißsubstanzen verschiedenster Herkunft spezifische Eiweißkörper synthetisch erzeugt; die Erfahrungen über Präzipitine, Lysine und Agglutinine zeugen ebenfalls von den spezifischen, biologischen Unterschieden der Eiweißkörper. Die auffällige Längenentwicklung des Darmkanals der mit Pflanzen und Pflanzenproteinen ernährten Froschlarven könnte man als zweckmäßige Reaktion auf die allzu fremden Eiweißkörper der Nahrung auffassen; würde man die Leistung der Darmwand, durch welche aus den resorbierten Eiweißstoffen der Nahrung spezifische Eiweißkörper des gegebenen Tieres entstehen, als „Verdauungsarbeit“ bezeichnen, so liegt der Gedanke nahe, daß diese Verdauungsarbeit größer ausfallen würde bei der Ernährung mit den sehr wahrscheinlich chemisch und biologisch weit entfernten Pflanzenproteinen, als bei der Ernährung mit tierischen Eiweißkörpern. Da auch die Eiweißkörper der verschiedenen Tierklassen ohne Zweifel verschieden sind, glaubte ich an die Möglichkeit, daß die mit verschiedenem Fleisch gefütterten Kaulquappen größere Darmlängen ausweisen würden als die mit Froschfleisch ernährten, bei welchen die Verdauungsarbeit am geringsten wäre.

Die angeführten Ergebnisse jedoch führten zu dem Resultate, daß das Muschelfleisch, obzwar es gewiß den Froscheiweißkörpern (ähnlich wie das Krebsfleisch) sehr fern steht, doch eher kleinere Verdauungsarbeit bei den Froschlarven erfordert, als das Froschfleisch; das Krebsfleisch aber nähert sich stark in seiner Einwirkung den Verhältnissen bei Pflanzennahrung. Zwischen den einzelnen Arten von Wirbeltierfleisch ist keine auffällige Verschiedenheit der Gestaltungsreaktion zu verzeichnen. Nun ist

auch nach Atwaters[9]) Untersuchungen bekannt, daß im menschlichen Darm die Bestandteile des Fischfleisches ebenso gut ausgenützt werden, wie die des Rindfleisches. —

Es entsteht die Frage, wie sich die Verdauungsverhältnisse und Ausnutzbarkeit des Muschelfleisches und des Krebsfleisches gegenüber dem Fleisch der Wirbeltiere im menschlichen Darmkanal gestalten. Eine darauf bezügliche Arbeit wird in unserem Institute ausgeführt.

Noch eine Tatsache möchte ich anführen: Die mit Muschelfleisch gefütterten Kaulquappen wiesen die ganze Zeit hindurch ganz auffällig wenig Exkremente auf, so daß der Boden ihres Aquariums fast stets rein war; die mit Krebsfleisch ernährten Froschlarven zeigten dagegen viel Exkremente, ähnlich wie die mit Pflanzenproteinensubstanz gefütterten Tiere.

Die ausführliche Bearbeitung meiner sämtlichen, seit dem Jahre 1902 fortgesetzten experimentellen Untersuchungen über die Variabilität des Darmkanals in bezug auf die Ernährung wird demnächst in Roux's Archiv für die Entwicklungsmechanik erscheinen.

Literaturverzeichnis.

1) Babák, E., Über den Einfluß der Nahrung auf die Länge des Darmkanals. Biolog. Centralbl. **23**, Nr. 13—15 (1903).

2) Babák, E., Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Nahrung auf die Länge des Darmkanals. Centralbl. f. Physiol. **18**, Nr. 21 (1905).

3) Fürth, O. v., Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. 422—423 (1903).

4) Przibram, H., Versuche zur chemischen Charakterisierung einiger Tierklassen des natürlichen Systems auf Grund ihres Muskelplasmas. Diese Beiträge **2**, 143—147 (1902).

5) Hofmeister, F., Über Bau und Gruppierung der Eiweißkörper. Ergebn. der Physiol. I, **1**, 774 (1902).

6) Jolles, A., Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie **32**, 361 (1901).

7) Schulze, E., und Winterstein, E., Über die bei der Spaltung der Eiweißsubstanzen entstehenden basischen Produkte. Ergebn. d .Physiol. I, **1**, 45 (1902).

8) Pawlow, J. P., Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898, 133—135.

9) Atwater, W. O., Über die Ausnützung des Fischfleisches im Darmkanale im Vergleich mit der des Rindfleisches. Zeitschr. f. Biologie **24**, 26 (1888).

XVIII.

Über Veränderungen des Brechungsvermögens von Glykosiden und Eiweißkörpern durch Fermente, Säuren und Bakterien.

Von Prof. Dr. **Friedr. Obermayer** und Priv.-Doz. Dr. **Ernst P. Pick**.

Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. Ernst Freund) und dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf).

I.

Die Wirkungsweise der Fermente und die Bedingungen, von denen sie abhängt, bilden eines der anziehendsten und für die gesamte Biologie wohl wichtigsten Probleme und nichts bezeugt mehr die Bedeutung dieser Frage als die große Zahl der Arbeiten, welche ihr in den letzten Jahren von den hervorragendsten Forschern gewidmet worden sind.

Die Fortschritte, welche dadurch in der Erkenntnis der spezifischen, von der Konfiguration des Substrates so mannigfach beeinflußten fermentativen Wirkung auf Kohlenhydrate und in jüngster Zeit auch auf Eiweißkörperderivate erzielt worden sind, waren im wesentlichen auf rein chemischem Wege gewonnen worden, falls man von der Beobachtung der optischen Aktivität absieht, welche allerdings seit Pasteur eines der wichtigsten Kriterien fermentativer Zustandsänderungen geworden ist.

Die Ursache, daß trotz der Einreihung enzymatischer Wirkungen in die Gruppe der spezifischen katalytischen Vorgänge und der Anwendung physikalisch-chemischer Gesetze auf ihren Reaktionsverlauf die physikalischen Methoden nicht öfters zur Charakterisierung der spezifischen Wirkungsweise von Fermenten herangezogen worden sind, mag darin seinen Grund haben, daß man konstitutive Veränderungen, auf die es bei dem vorliegenden Problem am meisten ankommt, durch die bisher geübten Methoden nur im beschränkten Maße oder überhaupt nicht

zu erkennen vermochte, und daß selbst die quantitativen Vorgänge der Fermentspaltung auf diesem Wege wegen der nicht zu vermeidenden methodischen Fehler nur mit großer Vorsicht verfolgt werden können. Da sie sich jedoch in der Bequemlichkeit ihrer Anwendung den chemischen Methoden vielfach überlegen erweisen, wurden sie beim Studium des Reaktionsverlaufes von fermentativen Prozessen schon mannigfach angewandt.

So haben Emil Schütz[1]) und Schütz und Huppert[2]) durch polarimetrische Messung des gebildeten Peptons zum erstenmal 1885 das bekannte Gesetz der Pepsinwirkung gefunden. Tammann[3]) hat mit Hilfe des Polaristrobometers bei der Wirkung des Emulsins auf das Arbutin und Koniferin die Abhängigkeit der Menge der gebildeten Spaltungsprodukte von der Fermentmenge verfolgt. Den gleichen Zweck suchte Klug[4]) mit Hilfe eines von dem Verhalten der Biuretreaktion abhängigen spektrophotometrischen Verfahrens zu erreichen und auch in jüngster Zeit haben Lawrow[5]), Siegfried[5a]), Gamgee und Jones[5b]) und Gamgee und Croft Hill[5c]) den Gang der Spaltung von Eiweißkörpern durch Säuren, Pepsin und Trypsin mittels des Polarimeters kontrolliert.

Ein anderes ebenfalls für den quantitativen Verlauf proteolytischer Fermentspaltungen benutztes Verfahren ist das von Mett[5d]), Borissow[6]), Jul. Schütz[7]) und Linossier[8]) verwendete, bei dem die Länge der verdauten Eiweißsäule mittels einer Lupe gemessen wird. Weniger brauchbar für den quantitativen Reaktionsverlauf proteolytischer Fermente, im speziellen der Pepsin-Salzsäure-Verdauung, erwies sich die Gefrierpunktsbestimmungsmethode, da einer durch den Zerfall des Eiweißmoleküls eintretenden Zunahme der molekularen Konzentration, welche sich in einer Gefrierpunktdepression ausdrücken müßte, die durch Salzsäurebindung an die entstandenen Spaltungsprodukte erzeugte Verminderung der Molenzahl entgegenwirkt, so daß, wie die Untersuchungen von Friedenthal[9]) und Oker-Blom[10]) übereinstimmend lehren, diese Methode keine Auskunft über die stattgehabte Spaltung zu geben vermag.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Prüfung der elektrischen Leitungsfähigkeit; auch hier kann nicht entschieden werden, inwieweit der bloße peptische Zerfall des Eiweißmoleküls allein die elektrische Leitungsfähigkeit beeinflußt, da auch hier wieder durch die gleichzeitige Bindung der Salzsäure [siehe Sjöqvist[11])] der Leitungswiderstand vor und nach der Spaltung entweder nahezu gleich bleibt (Friedenthal) oder vergrößert wird (Oker-Blom).

Übersichtlichere Werte ergeben dagegen, wie die Untersuchungen Oker-Bloms zeigen, die beiden letzteren Methoden bei der Trypsinspaltung, indem sowohl die elektrische Leitfähigkeit, als auch die Gefrierpunktsbestimmung entsprechend der Bildung von Elektrolyten bis zu einer gewissen Grenze zunimmt. Dabei erweist sich jedoch die kryoskopische Methode als die weniger empfindliche. In ähnlicher Weise haben jüngst V. Henri und Larguier des Bancels[11a]) mittels Leitfähigkeitsmessungen die Einwirkung von Trypsin auf Gelatine studiert. Erwähnenswert sind noch die Versuche O. Nasses[11b]), denen zufolge bei der Einwirkung der Diastase auf eine Stärkelösung der Leitungswiderstand abnimmt.

Eine andere Methode, um die Pepsinwirkung zu messen, hat E. J. Spriggs[12]) angewandt; er konnte mit Hilfe des Ostwaldschen Viskosimeters feststellen, daß die Viskosität während der Verdauung in gesetzmäßiger Weise mit dem Verschwinden der Koagulierbarkeit abnimmt, wobei Beziehungen zwischen der Pepsinmenge und der Geschwindigkeit der Verdauung analog der Schütz-Borissowschen Regel erkennbar werden. Die Viskositätsabnahme erreicht ihre Grenze, sobald der größte Teil der koagulierbaren Eiweißkörper in unkoagulierbare umgewandelt ist.

Endlich soll nicht unerwähnt bleiben, daß Fuld[13]) die positive Wärmetönung der Labwirkung gemessen hat und Herzog[14]) die Wärmetönung in einer Reihe fermentativer Vorgänge berechnete, wobei sich die interessante Tatsache ergab, daß die reinen Stoffwechselvorgänge mit geringem oder keinem Energieverlust für den Körper verbunden sind, während die Organismen bei den Gährungen und Oxydationen bedeutende Wärmemengen gewinnen [vergl. Tangl und Farkas[15]), M. Rubner[15a])].

Überblickt man die angeführten Methoden, so sieht man, daß die damit erhaltenen Resultate kaum einen Einblick in die konstitutiven Verhältnisse des dem Fermenteinflusse unterliegenden Körpers oder dessen Spaltungsprodukte gewähren und ebensowenig, mit Ausnahme der Bestimmung der Wärmetönung, irgend etwas über den Gleichgewichtszustand der Fermentmischung vor und nach erfolgter Reaktion aussagen.

Wir haben daher den Versuch unternommen, eine für den vorliegenden Zweck noch nicht erprobte Methode, nämlich jene der Bestimmung der Refraktion anzuwenden, zumal diese nicht allein die additiven d. h. durch Art und Zahl der Atome eines Moleküls bedingten Eigenschaften, sondern in hervorragender

Weise, wie insbesondere die klassischen Untersuchungen Brühls[15b]) lehren, auch die Konstitution, d. h. die Anordnung und gegenseitige Beziehung der Bestandteile einer Verbindung auszudrücken erlaubt. Und gerade bei den fermentativen Reaktionen schien es uns von größtem Interesse zu sein, mit einer empfindlichen Methode zu prüfen, ob ein Gleichgewichtszustand unter allen Umständen vorhanden ist oder nicht und welcher Art etwa die Abweichungen vom einfachen additiven Verhalten der Fermentmischungen im Verlaufe der Reaktion wären.

Es ist umso auffälliger, daß bisher die Fermentreaktionen nicht mittels des Brechungsvermögens untersucht worden sind, als ja kaum, wie Nernst hervorhebt, eine andere Eigenschaft der Flüssigkeiten einer so einfachen und genauen Bestimmung fähig ist, wie das Lichtbrechungsvermögen. Daß von dieser außerordentlich exakten Methode auf dem Gebiete der reinen Chemie bei der Konstitutionsermittlung mit großem Erfolge Gebrauch gemacht werden kann, davon legen u. a. gerade die Arbeiten Brühls[15b]) und seiner Mitarbeiter über die Ester der Kamphocarbonsäuren, sowie die Salze des Acetessigesters, deren Konstitution auf rein chemischem Wege nicht ermittelt werden konnte, Zeugnis ab.

Dagegen ist die Benützung des Refraktometers für biochemische Zwecke bisher eine spärliche geblieben. So hat Ellinger[16]) 1891 diese Methode benützt zur Bestimmung der gelösten Substanz in Lösungen von Eiweiß und vor relativ kurzer Zeit hat neuerdings Strubell[17]) mittels des neuen Pulfrichschen Eintauchrefraktometers eine Reihe von Untersuchungen im Blut und Urin ausgeführt, welche sich auf die Feststellung des Brechungsexponenten von normalen und pathologischen Harnen, sowie des Blutes und einiger krankhaften Gewebsflüssigkeiten beziehen. Grober[18]) hatte das gleiche Verfahren zur Bestimmung von Eiweiß und Zucker im Urin verwendet und in jüngster Zeit hatten sowohl E. Reiß[19]) als auch Strauß[20]) und Strauß und Chajes[21]), der erstgenannte mittels des Eintauchrefraktometers, die letzteren mit dem Abbeschen Apparat größere Untersuchungsreihen an menschlichen Gewebssäften insbesondere in bezug auf ihren Eiweißgehalt angestellt und gefunden, daß die so ermittelten Werte mit den sich aus anderen Methoden, so nach Kjeldahl ergebenden, gut übereinstimmten.

Bemerkenswert sind endlich die Angaben von Reiß[19]), daß die durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat aus dem Pferdeserum isolierten Eiweißkörper, das Euglobulin, Pseudoglobulin und

das kristallisierte Albumin von einander nur wenig abweichende Brechungsexponenten darbieten und ferner die bisher unaufgeklärte Tatsache, daß der Brechungsexponent des Gesamtserums wesentlich kleiner ist als jener der daraus dargestellten Eiweißkörper.

In allerjüngster Zeit hat Krause[22]) in Briegers Institut die Refraktion zur Identifizierung der Konstitution verschiedener als Pfeilgifte benützter Glykoside sowie der Glykoside der Digitalisgruppe angewandt und schließlich hat Pregl[23]) mit Hilfe der Molekular-Refraktion und Dispersion die Kohlenstoffbindung in der Cholalsäure und deren Derivaten zu ermitteln versucht.

II. Versuchsanordnung.

Unsere Versuche gingen vor allem dahin, die Veränderungen, welche das Lichtbrechungsvermögen der Glykoside, der Eiweißkörper und einfacherer Eiweißabkömmlinge durch Ferment- und Säureeinwirkung erfährt, genauer festzustellen. Im Anschluß daran wurde die Änderung der Refraktion bei bakterieller Zersetzung der Nährböden studiert.

Die Messungen wurden mit dem Pulfrichschen Apparat [Neukonstruktion*)] ausgeführt, der eine ungemein exakte Ablesung bei einer bestimmten auf $^1/_{10}$ Grade zu regulierender Temperatur gestattet und noch bis auf 1 Einheit der 4. Dezimale völlige Genauigkeit bietet. Als Lichtquelle wurde stets die Natronflamme verwendet.

Die zu untersuchenden Flüssigkeiten wurden mit dem betreffenden Ferment versetzt, unter Toluolzusatz in den Brutschrank eingestellt und durch möglichst festen Verschluß sorgfältig vor Verdunstung geschützt. Unmittelbar vor dem Versuche wurde stets eine etwas größere Flüssigkeitsmenge, als zur Bestimmung nötig war, mit einer Pipette unterhalb der Toluolschicht dem Kölbchen entnommen und in einer größeren Eprouvette durch Luftdurchleitung von dem noch in der Flüssigkeit gelösten Toluol befreit. Das Durchleiten muß möglichst langsam geschehen, um ein Mitreißen von Flüssigkeitsteilchen zu verhindern; zur Verhütung von merklicher Verdunstung läßt man die Luft zuerst durch eine kleine mit destilliertem Wasser gefüllte Waschflasche treten, worin sie sich mit Wasserdampf sättigt. So gelingt es leicht, die etwa 2 bis 3 ccm fassende Flüssigkeit in 5 bis 10 Minuten von Toluol völlig zu befreien. Wiederholt ohne Toluol aufgestellte Kontrollproben ergaben uns die volle Verläßlichkeit dieses Verfahrens.

In Fällen, wo flüchtige Produkte gebildet worden waren, wo also das Verfahren nicht anwendbar war, ist dies bei den entsprechenden Versuchen besonders bemerkt, ebenso das bei den Säurespaltungen eingeschlagene Verfahren.

---

*) Zeitschrift für Instrumentenkunde 1895, S. 389.

III. Spaltung der Glykoside.

A. Wirkung von Emulsin auf Amygdalin.

1. Versuch.

0,3 g Amygdalin (Trommsdorff) wurden in 30 ccm H_2O gelöst; zu diesen werden 5 ccm einer klar filtrierten Emulsinlösung, welche 0,1 g Emulsin enthält, zugefügt.

Unmittelbar nach der Mischung wird an einer Probe der Lösung die Bestimmung des Brechungsvermögens bei einer Temperatur von 25° vorgenommen. Der Rest wird ohne Zusatz eines Antiseptikums in den auf 46° (der optimalen Temperatur nach Tammann) eingestellten Brutschrank gebracht. In bestimmten Intervallen werden davon Proben zur Bestimmung entnommen.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung der Skala des Apparates	Brechungsexponent
a) 28./XI. 12^h 30′	Entnahme unmittelbar nach der Mischung	66° 57′	1,334517
b) 28./XI. 5^h 30′	5 Stunden	66° 56′	1,334596
c) 29./XI. 12^h mitt.	23 Stunden 30′	66° 57′	1,334517
d) 30./XI. 12^h mitt.	47 Stunden 30′	66° 57′	1,334517

Die Titration nach Knapp ergibt jetzt, daß die Flüssigkeit 0,42 Proz. Zucker enthält.

Demnach mußten 62 Proz. der theoretisch spaltbaren und etwa 73 Proz. der praktisch überhaupt erreichbaren Menge des Amygdalins durch das Ferment gespalten worden sein. Trotzdem ist während des ganzen Verlaufes der Reaktion der Brechungsindex unverändert geblieben.

Um zu prüfen, welchen Ausschlag unter ähnlichen Bedingungen eine 0,4 proz. Zuckerlösung in einer Emulsinlösung liefert, wurden nachfolgende Bestimmungen angestellt.

Je 10 ccm einer klaren Emulsinlösung, welche in 35 ccm 0,2 g Emulsin enthielt, wurden einmal mit (a) 2,5 ccm einer 2 proz. Traubenzuckerlösung, so daß die Lösung 0,4 Proz. Zucker enthielt, ferner mit (b) 2,5 ccm Wasser versetzt.

a) Emulsin + Zucker	67° 10′	1,33350
b) Emulsin + H_2O	67° 17′	1,332954

Man ersieht daraus, daß eine 0,4 proz. Zuckerlösung einen Ausschlag von 54,6 Einheiten der 5. Dezimale, also eine bedeutende Erhöhung des Brechungsexponenten herbeiführt, die im übrigen in guter Übereinstimmung mit dem von Wagner*) angegebenen Brechungsindex für eine 0,4 proz. Traubenzuckerlösung steht.

*) B. Wagner: Über quantitative Bestimmung wässeriger Lösungen mit dem Zeissschen Eintauchrefraktometer. Dissertation, Jena 1903.

Es würde daher von den drei Zerfallsprodukten des Amygdalins, Zucker, Blausäure und Benzaldehyd, an und für sich schon das Freiwerden der einen Komponente genügen, um das optische Gleichgewicht der Mischung zu stören.

2. Versuch.

0,2 g Emulsin wurden in 35 ccm Wasser gelöst; 12,5 ccm der klar filtrierten Fermentlösung mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, dienten zur Auflösung von 1 g Amygdalin. Eine Probe der filtrierten Lösung wird der sofortigen Bestimmung bei 25° unterzogen, während ein Teil, wie früher ohne Antiseptikum, in den Brutschrank, und ein zweiter Teil in den Eisschrank gebracht wird.

Die Herstellung konzentrierterer Amygdalinlösung war für den vorliegenden Fall nicht möglich, da größere Mengen abgespaltenen Benzaldehyds sich aus der wässerigen Lösung in Tropfen abscheiden und die Bestimmung der Refraktion der Gesamtlösung hindern.

Die Bestimmungen ergaben:

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung der Skala des Apparates	Brechungsexponent
a)	3./XII. 7h 15' abends	unmittelbar nach der Aufstellung	66° 04'	1,33873
b)	4./XII. 6h abends	22 Stunden 45'	66° 04'	„
c)	5./XII. 12h mittags	64 Stunden 45'	66° 05'	1,33865
d)	6./XII. 12h mittags	Im Eisschrank gehaltene Probe	66° 05'	„

Die Zuckerbestimmung in einer in gleicher Weise hergestellten Kontrollprobe ergab bei beendigter Fermentwirkung nach Knapp einen Zuckergehalt von 2,4 Proz. Es waren demnach 72 Proz. des Amygdalins aufgespalten worden.

3. Versuch.

0,1 g Emulsin und 0,3 g Amygdalin wurden in 35 ccm H_2O gelöst, die Lösung klar filtriert und wie früher untersucht. Die Ablesungen erfolgten bei 25,1°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung der Skala des Apparates	Brechungsexponent
a)	21./I. 7h abends	unmittelbar nach der Entnahme	67° 00'	1,33428
b)	23./I. 11h vormittags	40 Stunden	67° 00'	„

Die Titration mit Knappscher Lösung ergab einen Zuckergehalt von 0,47 Proz.; es waren demnach etwa 70 Proz. des Amygdalins gespalten oder etwa 82 Proz. der durch das Ferment überhaupt spaltbaren Menge.

Wie die vorliegenden so ergaben auch weitere in ähnlicher Weise ausgeführte Versuche, die wir nicht weiter hier anführen wollen, daß der Brechungsexponent trotz weitgediehener Spaltung konstant bleibt.

B. Wirkung von Emulsin auf Salicin.

1. Versuch.

1 g Salizin wurde in 30 ccm H_2O gelöst; andererseits wurde eine Emulsinlösung hergestellt, welche 0,4 g Emulsin in 24 ccm Wasser gelöst enthielt. Je 10 ccm beider Lösungen wurden gemischt, eine Probe sofort untersucht, der Rest bei 46° gehalten.

Die Lösungen wurden vor bakterieller Zersetzung dadurch geschützt, daß der das Kölbchen gut verschließende Korkstopfen an der der Flüssigkeitsoberfläche zugekehrten Seite mit Formalin befeuchtet wurde. Ablesungstemperatur 25°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung der Skala des Apparates	Brechungsexponent
a)	5./XII. 04 $7^1/_2{}^h$ abends	Entnahme nach der Mischung	66° 37′	1,336097
b)	5./XII. 04 9^h abends	$1^1/_2$ Stunden	66° 37′	„
c)	6./XII. 04 11^h vormittags	$15^1/_2$ Stunden	66° 36′	1,336176
d)	7./XII. 04 8^h abends	$48^1/_2$ Stunden	66° 36′	„

2. Versuch.

0,1 g Emulsin und 1,0 g Salicin in 35 ccm Wasser gelöst. Sonst wie im vorigen Versuch. Ablesungstemperatur 25,3°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung des Brechungswinkels am Apparat	Brechungsindex
a)	21./I. 05 7^h abends	Entnahme sofort nach d. Herstellung der Lösung	66° 17′ 30″	1,33845
b)	23./I. 05 $11^1/_2{}^h$ vormitt.	$40^1/_2$ Stunden	66° 17′ 30″	„

Die mit der Fermentlösung ausgeführte Zuckerbestimmung ergab einen Gehalt von 1,69 Proz. Zucker.

Es war also auch hier, trotzdem der größte Teil des Glykosids aufgespalten worden war, eine Änderung des optischen Verhaltens nicht eingetreten.

C. Wirkung von Ptyalin auf Dextrin.

20 ccm 5proz. Dextrinlösung werden mit 10 ccm frischen klaren Speichels versetzt, gut gemischt und klar filtriert; als Kontrolle für die Zuckerbestimmung der leicht zuckerhaltigen Dextrinlösung werden ebenfalls

20 ccm derselben mit 10 ccm Wasser verdünnt. Auch hier wird der Korkstopfen mit Formaldehyd vorsichtig befeuchtet. Ablesungstemperatur 25°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Ablesung des Brechungswinkels	Brechungsindex
a)	7./XII. 04 $7^1/_2{}^h$ abends	Entnahme unmittelbar nach der Mischung	66° 18′	1,33761
b)	8./XII. 04 $11^1/_2{}^h$ mittags	16 Stunden	66° 17′	1,33769
c)	8./XII. 04 8^h abends	$23^1/_2$ Stunden	66° 17′	1,33769

Die Zuckerbestimmung der Fermentlösung ergab nach dieser Zeit 1,6 Proz. Zucker. Die ungespaltene Kontrollösung dagegen gab eine Reduktion entsprechend 0,3 Proz. Zucker.

Es war somit auch hier der größte Teil des Dextrins durch Ptyalin aufgespalten worden, ohne daß eine nennenswerte Änderung im Brechungsexponenten eingetreten wäre.

Die angeführten Versuche über fermentative Spaltung der Glykoside ergeben übereinstimmend, daß der Brechungsexponent vor der Spaltung derselbe ist, wie nach der Spaltung, daß somit der Brechungsexponent der Summe der Spaltungsprodukte gleich sein muß dem Brechungsexponenten des ungespaltenen Moleküls.

Da sich ferner eine Strukturänderung, so eine Änderung der Bindungsart, sei es des C, O oder N in einer Änderung der Brechung wohl ausdrücken würde, so kann mit Wahrscheinlichkeit weiter gefolgert werden, daß der fermentative Prozeß bei der Aufspaltung von Amygdalin, Salicin und Dextrin mit keiner eingreifenderen Atomumlagerung einhergehen dürfte. Es scheint vielmehr die Konstanz des Brechungsindex zu beweisen, daß während des ganzen Verlaufes der Reaktion ein Gleichgewichtszustand besteht, der sich auch nicht ändert, wenn der Prozeß seine volle Höhe erreicht hat.

Bekanntlich ist es in den letzten Jahren gelungen, [Croft Hill[24]), Emmerling[25]), Kastle und Löwenhart[26]), Hanriot[27]) und Fischer und Armstrong[28])], manche Fermentreaktionen dadurch als chemische Gleichgewichtszustände zu erweisen, daß die Umkehrbarkeit der Fermentwirkung, also die Synthese der aufgespaltenen Produkte, dargetan werden konnte.

Und da scheint es besonders bemerkenswert, daß es Emmerling geglückt ist, die synthetische Wirkung eines Fermentes, der

Hefemaltase, gerade auf die Spaltungsprodukte des Amygdalins nachzuweisen, indem er aus Glykose und Mandelsäurenitrilglykosid ein wiederum durch Maltase spaltbares Amygdalin erhalten konnte.

Es scheint aus unseren Versuchen hervorzugehen, daß für die synthetische Darstellung auch der übrigen Glykoside ähnlich günstige physikalische Vorbedingungen vorliegen. Bezüglich der Spaltung des Salicins mag es hier von Interesse sein, darauf hinzuweisen, daß die Verbrennungswärmen von Dextrose und Salicylalkohol nahezu gleich sind jener von Salicin, wie die Zusammenstellung von Herzog[29]) lehrt, daß sich also auch auf diesem Wege ein Gleichgewichtszustand zwischen Spaltungsprodukten und gespaltener Substanz nachweisen läßt.

D. Säurespaltung des Phloridzins.

Um den Einfluß der Säurespaltung eines Glykosids auf die Brechung zu prüfen, wählten wir die Zersetzung des Phloridzins durch Schwefelsäure.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß eine sorgfältig abgemessene Menge Phloridzin in einem Meßkölbchen mit 5 proz. H_2SO_4 etwa 1 bis $1^1/_2$ Stunden bis zum Ausfallen des Phloretins auf dem Wasserbade unter Vermeidung von Verdunstung zersetzt wurde. Dann wurde die Lösung mit Lauge neutralisiert, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und bestimmt.

Als Kontrolle diente ein zweites Meßkölbchen mit gleicher Phloridzin- und Säuremenge, das in der Kälte belassen wurde, sonst aber genau derselben Behandlung unterlag wie das Reaktionsgemenge.

1. Versuch.

0,6 g Phoridzin (Trommsdorff) wurden mit 25 ccm 5 proz. H_2SO_4 in der angegebenen Weise gespalten, das ausgefallene Phloretin in Lauge gelöst und mit Wasser bis zur Marke des Meßkölbchens auf 50 ccm aufgefüllt.

Das Kontrollkölbchen mit 20,6 g Phloridzin und 25 ccm H_2SO_4 wird mit der gleichen Menge Lauge und Wasser versetzt.

Die Bestimmung, bei 24,8° ausgeführt, ergibt:

a)	Gespaltenes Phloridzin	64° 38′	1,345806
b)	Ungespaltenes Phloridzin	64° 39′	1,345723

Während das ungespaltene Phloridzin keine Reduktion aufwies, ergab die Zuckerbestimmung der aufgespaltenen Probe einen Prozentgehalt von 0,46 Proz. Zucker für die unverdünnte Lösung, was der theoretisch abspaltbaren Zuckermenge gleichkommt.

Trotz der völligen Aufspaltung des Phloridzins war anscheinend keine wesentliche Änderung im Brechungsindex eingetreten. Dem gegenüber muß ein zweiter Versuch angeführt werden, der in analoger Weise angestellt kein so eindeutiges Resultat ergab.

2. Versuch.

1,5 g Phloridzin wurden in 50 ccm 5proz. Schwefelsäure aufgeschwemmt, möglichst sorgfältig verteilt und die Flüssigkeit in 2 gleiche Teile geteilt. Die eine wird durch mehrere Stunden auf dem Wasserbade im Meßkölbchen unter der Kapillare gekocht, die andere bei Zimmertemperatur belassen.

Nachdem die Spaltung, wie das reichlich abgeschiedene Phloretin bewies, beendigt war, wurden beide Kölbchen gleichzeitig in gleicher Weise mit Natronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 46 ccm aufgefüllt; die gespaltene Lösung unterscheidet sich durch die dunkelbraune Farbe vor der hellgelb gefärbten Phloridzinlösung.

Die Bestimmungen beider Lösungen wurden bei 26,2° ausgeführt und ergaben:

a) Gespaltenes Phloridzin	64° 36′	1,345972
b) Ungespaltenes Phloridzin	64° 33′	1,346221

Die Titration der beiden Lösungen ergab, daß die gespaltene Phloridzinlösung eine 0,55proz. Zuckerlösung darstellte (die völlige Aufspaltung hätte einen Gehalt von 0,65 Proz. verlangt), während die ungespaltene Kontrollprobe 0,075 Proz. Zucker aufwies.

3. Versuch.

Derselbe ergab in der gleichen Versuchsanordnung wie der eben angeführte für die beiden Lösungen folgende Werte: Ablesung bei 26°.

a) Gespaltenes Phloridzin	64° 35′ 64° 34′ 30″	1,346055
b) Ungespaltenes Phloridzin	64° 31′ 30″ 64° 32′	1,346304

Die beiden letzten Versuche zeigen, daß bei längerer Einwirkung der Säure das optische Gleichgewicht nicht mehr gewahrt bleibt, sondern daß eine Abnahme des Brechungsindex eintritt, welche die mögliche Fehlergrenze weit überschreitet.

Mit Rücksicht auf den ersten Versuch muß gefolgert werden, daß die Änderung des Brechungsindex nicht zu beziehen ist auf die Spaltung des Phloridzins in Glykose und Phloretin, sondern vielmehr auf sekundäre Umlagerungen eines dieser Spaltungsprodukte.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen Säure- und Fermentwirkung auf Glykoside scheint, soweit es sich aus dem Brechungsvermögen folgern läßt, nicht zu bestehen.

Die von E. Fr. Armstrong und R. J. Caldwell[30]) gefundenen Differenzen zwischen Säure- und Enzymwirkung, die hauptsächlich in der quantitativen Leistungsfähigkeit beider gelegen sind, werden durch unsere Befunde nicht berührt.

IV. Spaltung der Eiweißkörper.

A. Pepsin.

I. Pepsinverdauung des Rinderserums.

1. Versuch.

75 ccm salzfrei dialysiertes Rinderserum wurden mit dem gleichen Volumen ¼ n-Salzsäure versetzt; in 100 ccm dieser Mischung wurden 0,5 g eines gut wirksamen Pepsinpräparates (Pepsinum germanic.) gelöst. Unmittelbar nach Herstellung der Lösung, sodann in bestimmten möglichst kurz bemessenen Zeiträumen wurden der in den Thermostaten (40°) eingebrachten Verdauungsflüssigkeit Proben entnommen; vom 18./I. an wurde die Verdauungslösung dauernd im Brutschrank gehalten. Ablesungstemperatur 24,9°.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
1. 16./I. 5h 35' nachm.	Sofort nach der Mischung	65° 50'	1,33986	
2. „ 6h 21' abends	46 Minuten	65° 50'	„	Reichliche Acidalbuminbildung; langsam abnehmend
3. „ 7h 31' „	1 Std. 56 Min.	65° 50'	„	
4. „ 8h 31' „	2 „ 56 „	65° 50'	„	Von 8h 31' bis 10h 30' morgens, wurde die Lösung in der Kälte gehalten.
5. 17./I. 10h 30' morgens	2 „ 56 „	65° 50'	„	
6. „ 11h 30' „	3 „ 56 „	65° 50'	„	
7. „ 12h 30' nachm.	4 „ 56 „	65° 50'	„	
8. „ 1h 30' „	5 „ 56 „	65° 51'	1,33978	
9. „ 4h 30' „	8 „ 56 „	65° 50'	1,33986	Nur sehr spärliche Mengen koagulierbaren Eiweißes. Reichliche Albumosenbildung
10. „ 6h 30' abends	10 „ 56 „	65° 50' 30"	1,33982	
11. „ 8h 30' „	12 „ 56 „	65° 50'	1,33986	
12. „ 9h 30' „	13 „ 56 „	65° 50' 30"	1,33982	
13. 18./I. 10h morgens	26 „ 26 „	65° 50'	1,33986	
14. 19./I. 11½h vormitt.	51 „ 56 „	65° 50'	„	
15. 20./I. 11½h „	75 „ 56 „	65° 50'	„	
16. 21./I. 11½h „	99 „ 56 „	65° 50'	„	
17. 25./I. 11h „	8×24 Stunden	65° 50'	„	
18. 27./I. 11h „	10×24 „	65° 50'	„	

Die Tabelle zeigt, daß im Verlaufe der Verdauung, deren einzelne Phasen hier deshalb einer genauen Beobachtung unterzogen worden waren, um eventuelle auf kleinere Zeiträume verteilte Schwankungen der optischen Eigenschaften genau feststellen zu können, innerhalb der Beobachtungszeit keine Änderung des Brechungsexponenten eintrat.

Man weiß aus den so gründlichen Untersuchungen von Zunz[31]) über den Ablauf der peptischen Verdauung, daß die Pepsinwirkung schon in den ersten Stunden die durchgreifendsten Änderungen innerhalb des Eiweißmoleküls herbeiführt und wir konnten im Verlaufe anderweitiger Untersuchungen, die wir mit Hilfe der Präzipitinimmunsera durchführten, feststellen, daß nahezu unmittelbar nach Zusammenbringen einer Eiweißlösung mit Pepsinsalzsäure längstens schon nach einer Minute infolge der Pepsinwirkung eine völlige Änderung des Eiweißes in biologischer Hinsicht eintritt.

Und dennoch blieb hier, obwohl die qualitativen Reaktionen bereits nach 11stündiger Verdauung zeigten, daß koagulierbares Eiweiß nahezu völlig verschwunden war, die Refraktionsgröße in jeder Verdauungsphase durchaus unverändert.

Um den Einfluß bei länger dauernder Einwirkung kennen zu lernen, wurden Versuche einerseits von möglichst langer, über $^3/_4$ Jahre ausgedehnter Beobachtungsdauer ausgeführt, andererseits ein möglichst wirksames Ferment in Anwendung gebracht. Als ein solches äußerst kräftig spaltendes Präparat erwies sich amerikanisches Pepsin Fairchild, von der Firma Borroughs Wellcome und Co. in London bezogen.

Einige besonders instruktive Versuche seien im folgenden angeführt.

2. Versuch.

20 ccm salzfrei dialysierten Rinderserums werden mit dem gleichen Volumen $^1/_4$ n-Salzsäure versetzt und zu dieser Lösung wird 0,1 g Pepsin Fairchild, von dem 1 Teil 3000 Teile Eiweiß zu spalten vermag, zugefügt. Die Versuchsanordnung wie früher. Temperatur der Bestimmungen 24,5°.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a) 25./I. 05 12h mittags	Unmittelbar nach der Mischung	65° 53′	1,339617	
b) 26./I. 05 12h vormittags	24 Stunden	65° 53′	„	
c) 27./I. 05 11h vormittags	47 Stunden	65° 53′ 30″	1,339577	Spuren von Acidalbumin, kein koagulables Eiweiß, mit Essigsäure - Ferrocyankali keine Trübung; Halbsättigung mit Ammonsulfat keine Fällung, bei Ganzsättigung reichliche Fällung.
d) 28./I. 05 12h vormittags	72 Stunden	65° 53′	1,339617	
e) 29./I. 05 12h mittags	96 Stunden	65° 53′ 30″	1,339577	
f) 31./I. 05 12h mittags	144 Stunden	65° 53′	1,339617	

Die zuletzt entnommene Probe enthält kein Acidalbumin mehr, kein koagulables Eiweiß, keine durch Halbsättigung mit Ammonsulfat aussalzbare Albumosen; bei voller Sättigung mit Ammonsulfat und bei saurer Reaktion gelingt es nur spärliche feine Flocken auszufällen. Die Lösung enthält auch sonst nur eine Spur von Deuteroalbumosen.

Man ersieht aus den angeführten Reaktionen, sowie aus dem quantitativen Verhalten der einzelnen Fraktionen, daß der Abbau des Rinderserums durch Pepsinsalzsäure nahezu vollständig war, während, wenn man von den geringen, in die Versuchsfehlergrenzen fallenden Differenzen absieht, der Brechungsindex nahezu konstant geblieben ist.

3. Versuch.

60 ccm frischen Rinderserums, 60 ccm $^1/_4$ n-Salzsäure, in welcher diesmal 0,3 g Pepsin Fairchild gelöst worden waren. Temperatur der Ablesungen 24,8°.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a) 20./I. 05 1^h mittags	Entnahme unmittelbar nach der Mischung	65° 25′ 30″	1,341863	
b) 21./I. 05 11^h vormittags	22 Stunden	65° 25′	1,341905	Spur Acidalbumin, koagulables Eiweiß nicht mehr sicher nachweisbar, Essigs.-Ferrocyankalium erzeugt leichten flockigen Niederschlag; ebenso bei Ammonsulfatsättigung spärliche Flockenbildung.
c) 22./II. 05 11^h mittags	33 Tage	65° 24′ 30″	1,341946	
d) 11./III. 05 11^h mittags	50 Tage	65° 25′	1,341905	Keine Fällung mit Essigsäure-Ferrocyankalium + essigsaurem Natron; durch Sättigung mit Ammonsulfat eine leichte Fällung, wie im Pepsinpräparat allein. Reichliche Fällung mit Tannin und Essigsäure.
e) 20./III. 05 12^h mittags	59 Tage	65° 24′	1,341988	Der gleiche Befund.
f) 29./III. 05 12^h mittags	68 Tage	65° 25′	1,341905	Reichliche Gerbsäurefällung in saurer Lösung.

Die quantitative Analyse der Fraktionen, welche durch die Tanninessigsäurefällung und nachfolgende Phosphorwolframsäurefällung erhalten worden waren, ist in nachstehender Tabelle zusammengestellt; Albumosen waren nur spurenweise vorhanden und konnten daher vernachlässigt werden.

Aus 50 ccm Verdauungslösung wurde erhalten:

1. Gerbsäure-Niederschlag	0,13475 g N oder	44,7 Proz. des Gesamt-N
2. Phosphor-Wolframsäure-Niederschlag	0,0651 g N oder	21,6 " " "
3. Phosphor-Wolframsäure-Filtrat	0,10115 g N oder	33,6 " " "
4. Gesamt-N	0,30100 g N	99,9 " " "

Diese Zahlen entsprechen, wenn man die Summe der beiden ersten Fraktionen berechnet, nahezu vollkommen jenen, wie sie E. Zunz bei seinen Untersuchungen über den Verlauf der peptischen Eiweißspaltung, so z. B. beim kristallisierten Serumalbumin oder beim Euglobulin nach 30tägiger Verdauung erhalten hat und zeigen, daß das Serumeiweiß tatsächlich in die weitest abstehenden Spaltungsprodukte umgewandelt worden war, die eben durch das Pepsinferment noch erzeugt werden können.

Trotzdem war während des ganzen Verlaufes der 68tägigen Verdauung der Brechungsexponent unverändert geblieben.

4. Versuch.

200 ccm nativen Rinderserums werden mit 200 ccm 1/4 n-Salzsäure verdünnt und mit 1 g eines gut wirksamen Pepsins (Pepsinum germanic.) versetzt.

Die Lösung wird sofort nach ihrer Herstellung (am 20. V. 04, 4 Uhr 30 Min.) mittels des Pulfrichschen Eintauchrefraktometers untersucht; hierauf bleibt sie gut verschlossen bis zum 26. XI. 04 — also 1/2 Jahr im Brutschrank und wird endlich am 13. II. 05, also nach 3/4 Jahren, wiederum untersucht.

Zur Kontrolle werden außerdem, um eventuelle Fehlerquellen, welche sich durch die erste, mit dem uns damals nur zur Verfügung stehenden Eintauchrefraktometer ausgeführte Bestimmung gegenüber den späteren, mit dem Pulfrichschen Apparate durchgeführten Untersuchungen ergeben konnten, auszuschließen, am 26. XI. 04 und 13. II. 05 mit frischem Rinderserum Verdauungslösungen von der Zusammensetzung der ersten, am 20. V. 04 bereiteten Mischung angesetzt.

Die Resultate der Bestimmung waren folgende:

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-einwirkung	Temperatur während der Ablesung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	20./V. 04	Entnahme sofort nach der Herstellung	37°	34° 00′	1,34048	Bestimmung mit dem Eintauchrefraktometer
b)	26./XI. 04	1/2 Jahr	37°	65° 40′	1,34067	Bestimmung mit dem Pulfrichschen Apparat
c)	Kontrollösung 26./XI. 04	Entnahme sofort nach der Herstellung	37°	65° 42′	1,340508	Bestimmung mit dem Pulfrichschen Apparat
a′)	13./II. 05	3/4 Jahr	24,8°	65° 24′	1,341988	
b′)	Kontrollösung 13./II. 05	Entnahme sofort nach der Herstellung	24,8°	65° 24′	1,341988	

Die qualitative Untersuchung einer am 26. XI. entnommenen Probe der Verdauungslösung ergab, daß kein koagulables Eiweiß in der Lösung mehr nachzuweisen war; die Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe zeigt nach Zusatz eines Tropfens essigsauren Natrons nur eine leichte Trübung.

Die am 13. II. 05 geprüften Proben verhielten sich folgendermaßen: Die Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe ergibt auch nach vorherigem Zusatz von essigsaurem Natron geprüft nur leichte Trübung; nach Sättigung mit festem Ammonsulfat bei saurer Reaktion Abscheidung einer mäßig reichlichen Albumosenmenge; das Filtrat der mit Ammonsulfat gesättigten Lösung gibt dagegen auf Zusatz von Jodquecksilberkalium und Salzsäure eine reichliche Peptonfällung.

Die quantitative Untersuchung erstreckte sich auf 1. die Menge des etwa noch vorhandenen koagulablen Eiweißes, 2. der gebildeten durch Zinksulfat bei saurer Reaktion aussalzbaren Albumosen, 3. auf den mit Gerbsäure und Essigsäure ausfällbaren und nicht mehr durch Salzsättigung fällbaren Körper*) (Polypeptide), 4. auf die mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure fällbaren Peptone und Diaminosäuren und 5. auf die mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure nicht fällbaren Aminosäuren.

Die Bestimmungen wurden derart ausgeführt, daß in einer Portion der koagulable Eiweißstickstoff und im Filtrat der mit Zinksulfat fällbare Albumosenstickstoff nach Kjeldahl bestimmt wurde, in einer zweiten Portion die Gerbsäurefällung und in deren Filtrat wieder die Phosphorwolframsäurefällung durchgeführt worden war; hierauf wurde der Stickstoff der beiden Fällungen und des Phosphorwolframsäurefiltrates bestimmt.

Zur Kontrolle diente der in einer Probe bestimmte Gesamtstickstoff.

Es ergab sich für 50 ccm der Verdauungsmischung vom 13. II:

1. Koagulable Eiweißkörper	0,002275 g N	oder 0,7 % des Gesamt-N
2. Albumosen	0,0875 „ „	„ 28,9 % „ „
3. Polypeptid (durch Subtraktion berechnet)	0,0868 „ „	„ 28,6 % „ „
4. Peptone und Diaminosäuren	0,0392 „ „	„ 12,9 % „ „
5. Aminosäuren	0,0882 „ „	„ 29,1 % „ „
Summe:	0,303975 g N	oder 100,2 %
Der Gesamtstickstoff beträgt:	0,30275 g N	

Vor der Verdauung war die Verteilung der koagulablen und nichtkoagulablen stickstoffhaltigen Produkte im angewandten Serum folgende:
10 ccm enthielten 0,11375 g N koagulablen Eiweißes
0,00385 g N der Koagulation nicht zugänglicher Körper.

II. Pepsinverdauung des kristallisierten Eieralbumins.

Nach Hofmeister dargestelltes, zweimal umkristallisiertes Eieralbumin wird 14 Tage lang gegen Hochquellwasser dialysiert; die so erhaltene konzentrierte salzfreie Eiweißlösung wird zu einem Teil mit Salz-

*) Es ist uns gelungen, diese abiureten Körper, die bereits Zunz[31]) gelegentlich der Kritik der Effrontschen Albumosengerbsäurefällung erwähnt, näher zu charakterisieren; wir behalten uns vor, darüber ausführlich zu berichten.

säure versetzt, so daß der Gehalt 0,4 Proz. beträgt und mit 0,1 g Pepsin (Fairchild) der Verdauung bei Bruttemperatur überlassen.

Die unmittelbar nach der Aufstellung und in bestimmten Zeitabständen ausgeführten Bestimmungen fanden sämtlich bei 24,9° statt.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	14./II. 05 7h abends	Probe unmittelbar nach der Mischung	66° 3′ 30″	1,33877	
b)	15./II. 05 6h abends	23 Stunden	66° 3′	1,33881	Kein koagulierbares Eiweiß, keine primären Albumosen, reichlich sekundäre Albumosen.
c)	18./II. 05 11h mittags	88 Stunden	66° 3′	„	
d)	22./II. 05 11h mittags	8 Tage	66° 3′	„	
e)	28./II. 02 6h abends	14 Tage	66° 2′ 30″	1,33885	

III. Pepsinversuch mit Wittepepton.

Aus dem folgenden Versuche ist weiter zu ersehen, daß die Pepsinsalzsäure auch bei direkter Einwirkung auf größere Albumosen- und Peptonmengen keine Änderung des Brechungsvermögens herbeiführt.

Der Versuch wurde derart angestellt, daß 50 ccm einer 7 proz. Wittepeptonlösung mit dem gleichen Volumen $^1/_4$ n-Salzsäure und 0,5 g Pepsin (Pepsin. germanic.) versetzt und vom 19. I. bis 11. III. im Brutschrank der Verdauung überlassen wurden; am 2. II. wurde ein Teil der Lösung neuerdings mit dem kräftiger wirkenden Pepsin Fairchild versetzt und weiter verdauen gelassen.

Temperatur der Ablesungen 24,8°. (Siehe erste Tabelle auf S. 348.)

Alle bisher mit Pepsinsalzsäure angestellten Versuche ergeben mit erstaunlicher Genauigkeit die Konstanz des Brechungsindex. Bei den zahlreichen chemischen Umsetzungen, die ja bei dem Zerfall des Eiweißes in die einfachsten Spaltungsprodukte nötig sind, muß dieses Verhalten einigermaßen überraschend erscheinen. Die Refraktion ist nach zahlreichen, äußerst exakten Untersuchungen nicht allein eine von den additiven Eigenschaften eines Moleküls abhängige Größe, sondern sie ist, wie schon früher hervorgehoben wurde, von den konstitutiven Eigenschaften im hohen Maße abhängig und mit diesen äußerst veränderlich; je größer die

Mannigfaltigkeit der Bindungsmöglichkeiten ist, umso wechselnder gestaltet sich das Brechungsvermögen. Und gerade da bieten nach den Untersuchungen von Brühl die Stickstoffverbindungen das wechselvollste Verhalten.

Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a) 19./I. 6h 30 Min. abends	Unmittelbar nach der Herstellung entnommen	65° 44′	1,340346	
b) 25./I. 11h vormittags	16½ Stunden	65° 45′	1,340265	Die Lösung enthält noch reichlich primäre Albumosen
c) 29./I. 12h mittags	113½ „	„	„	Primäre Albumosen nur in Spuren vorhanden
d) 2./II. 11h vormittags	13 Tage	„	„	Spuren primärer Albumosen und sehr geringe Mengen sekundärer Albumosen
e) 4./II. 11h vormittags	15 „	„	„	
f) 8./II. 11h vormittags	19 „	„	„	Der gleiche Befund
g) 13./II. 11h vormittags	24 „	„	„	„ „ „
h) 11./III. 11h vormittags	50 „	„	„	„ „ „

Der am 2. II. mit Pepsin Fairchild aufgestellte Anteil der Verdauungslösung ergab folgendes:

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a) 2./II. 12h mittags	Entnommen unmittelbar nach der Mischung	65° 41′ 30″	1,340548	
b) 4./II. 12h mittags	2 Tage	65° 41′ 30″	„	Keine primären Albumosen, Spuren sekundärer Albumosen
c) 8./II. 12h mittags	6 „	65° 41′	1,340589	Keine primären Albumosen, bei voller Sättig. mit Ammonsulfat leichte flock. Fällg., deren Filtrat gibt mit Jodquecksilberkalium und HCl reichliche Fällung
d) 13./II. 12h mittags	11 „	65° 41′	„	

Man hätte von vornherein erwarten dürfen, daß insbesondere der Abbau der hochmolekularen Stickstoffverbindungen, wie sie ja von den Eiweißkörpern dargestellt werden, in die ein-

fachsten Spaltungsprodukte — ein Vorgang, der abgesehen von den Veränderungen im C- und O-Bindungsvermögen nach bisherigen Vorstellungen die Stickstoffradikale in ihren Beziehungen zum Gesamtmolekül bedeutend verändert — ausgeprägte Schwankungen im Brechungsvermögen herbeiführt.

Nichts von alledem ist der Fall; vielmehr beweisen unsere Versuche, daß die proteolytische Wirkung des Pepsins dadurch charakterisiert ist, daß die Summe der Brechungsexponenten der gebildeten Spaltungsprodukte gleich ist dem Brechungsexponenten des ungespaltenen Eiweißkörpers oder daß das Pepsin stets nur derart wirkt, daß der Brechungsexponent konstant bleibt.

Ist es vorläufig bei der großen Reihe kaum übersehbarer Prozesse, die bei der Verdauung von Eiweißkörpern nebeneinanderlaufen, wohl nicht möglich, diese Tatsache mit irgendwelchen bestimmten Vorstellungen über die Konfiguration des Eiweißmoleküls zu verbinden, so sei es wenigstens gestattet, auf zwei Möglichkeiten hinzudeuten, die bei der Diskussion dieses merkwürdigen Verhaltens des Brechungsindex in Frage kommen könnten.

Es wäre zunächst möglich, daß wir es hier nur mit einer Resultierenden verschiedener nach entgegengesetzten Richtungen wirkender optischen Kräfte zu tun hätten und daß etwa jede Verminderung des Brechungsvermögens ausgeglichen würde durch eine an anderer Stelle sich abspielende Umlagerung, die eine ebenso große Vergrößerung der brechenden Kraft zur Folge hätte. Etwas Ähnliches findet ja bei dem Einflusse der Pepsinsalzsäureverdauung auf die elektrische Leitungsfähigkeit und die Gefrierpunktsdepression statt, bei welcher der durch das Ferment hervorgebrachte Einfluß durch die Wirkung der Salzsäure völlig aufgehoben erscheint. Ein solches Verhalten kommt bei der Refraktion freilich nicht in Betracht, zumal, wie aus den später anzuführenden Versuchen hervorgeht, die Salzsäure unter den bei der Pepsinwirkung obwaltenden Verhältnissen das Brechungsvermögen völlig unbeeinflußt läßt.

Auch scheint es im Hinblick auf die große Empfindlichkeit der Methode nicht sehr wahrscheinlich, daß bei der entgegengerichteten Wirkung verschiedener gleichzeitig angreifender Kräfte die Resultante nicht Schwankungen im Verlaufe der Spaltung ausgesetzt wäre; speziell aus den Stundenversuchen (Versuch I, 1) geht aber die selbst über die geringsten Schwankungen nicht hinausgehende Unveränderlichkeit des Brechungsindex hervor.

Es muß daher vielmehr an die Möglichkeit gedacht werden, daß die Wirkung des Pepsins nicht mit komplizierten, konstitutiven Umlagerungen verbunden ist, sondern daß sie ausschließlich präformierte Gruppen, die mit einander in einem nicht allzufesten Zusammenhange stehen, lockert oder von einander loslöst, so daß die Änderungen des Bindungsvermögens nach der Spaltung nicht hinreichen, um das optische Gleichgewicht zu ändern.

Daß diese Eigenschaft des Pepsins einen grundlegenden Unterschied gegenüber der tryptischen Wirkung, sowie der durch Bakterien hervorgebrachten Proteolyse bedeutet, geht aus den folgenden Versuchen hervor.

B. Trypsin.

Zu den nachfolgend angeführten Versuchen wurde ein äußerst kräftig wirksames Grüblersches Trypsin verwendet. Es braucht nicht besonders betont zu werden, daß es sich dabei nicht um ein einheitliches Ferment handelte. Wie gerade die jüngsten Untersuchungen von L. Pollak[32]) lehren, ist das „Trypsin“ regelmäßig ein Gemenge verschiedener Fermente. Inwiefern hierbei das Erepsin in Frage kam, soll vorläufig offen gelassen werden. Unser Präparat zeigte insbesonders eine kräftige Wirkung auf Wittes Pepton.

Da die Verdauungslösungen stets mit 0,4proz. Soda angesetzt wurden, war zunächst nötig, festzustellen, ob die Sodalösung an und für sich mit Eiweißkörpern zusammengebracht, bei längerer Einwirkung auf dieselben den Brechungsexponenten zu beeinflussen vermag und ferner, ob die Sodatrypsinlösung für sich bei längerem Stehen keine optische Änderung erfährt, zumal da unser Trypsinpräparat zwar nur spurenweise koagulables Eiweiß, aber merkliche Mengen Albumosen enthielt und eine blauviolette Biuretreaktion gab.

Die angestellten Versuche ergaben, daß weder in dem einen noch in dem andern Falle eine merkliche Beeinflussung des Brechungsexponenten stattfand, trotzdem des öfteren Entweichen von Ammoniak durch Blaufärbung des angefeuchteten über die Flüssigkeit gehaltenen Lackmuspapiers konstatiert werden konnte.

1. Kontrollversuch.

30 ccm Rinderserums werden mit der gleichen Menge 0,8proz. Sodalösung gemischt, von den ausgeschiedenen Phosphaten abfiltriert, mit Toluol versetzt und in den Brutschrank eingestellt.

Die refraktometrische Bestimmung findet bei 24,8° statt.

Entnahme der Probe	Dauer der Sodawirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) 14./I. 6h abends	Entnahme sofort nach der Mischung	65° 56′	1,339374
b) 18./I. 11½h mittags	3½ Tage	65° 56′	„
c) 26./I. 11½h „	10 „	65° 56′	„
d) 11./II. 12h „	28 „	65° 57′	1,339293

2. Kontrollversuch.

34 ccm einer 10proz. Wittepeptonlösung werden mit 0,8proz. Sodalösung zu gleichen Teilen versetzt und unter Toluol im Brutschrank gehalten. Temperatur der Ablesungen 24,8°.

Entnahme der Probe	Dauer der Sodawirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) 1./II. 12h mittags	Unmittelbar nach Herstellung der Lösung	65° 22′	1,342154
b) 1./II. 4h nachmitt.	4 Stunden	65° 22′	„
c) 11./II. 7h abends	10 Tage	65° 21′ 30″	1,342195
d) 13./II. 11h vormitt.	12 „	65° 21′	1,342247

3. Kontrollversuch.

In 15 ccm 0,4proz. Sodalösung werden 0,2 g Trypsin Grübler gelöst und die Flüssigkeit unter Toluol im Brutschrank 10 Wochen gehalten. Ablesungstemperatur 24,8°.

Entnahme der Probe	Dauer der Sodawirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) 14./II. 7h abends	Unmittelbar nach der Herstellung	66° 47′ 30″	1,335267
b) 15./II. 6h abends	23 Stunden	66° 48′	1,335238
c) 29./IV. 6h abends	10 Wochen	66° 48	1,335238

Es kann somit nach den angeführten Versuchen die Einwirkung der alkalischen Reaktion unserer Verdauungslösungen auf den Brechungsindex füglich ausgeschlossen werden.

I. Trypsinwirkung auf trypsinfestes Rinderserum und Eierklar.

1. Versuch.

50 ccm dialysierten Rinderserums wurden mit dem gleichen Volumen 0,8proz. Sodalösung, in welcher 0,5 g Grüblersches Trypsin gelöst worden war, versetzt, in den Brutschrank eingestellt und wie früher geprüft; die Ablesung erfolgte bei 24,8°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	14./I. 05 6h abends	Unmittelbar nach Herstellung der Lösung	65° 50′	1,33986	
b)	4./II. 05 7h abends	21 Tage	65° 51′	1,339779	
c)	22./II. 05 6h abends	39 „	65° 51′ 30″	1,339738	Massenhaft koagulables Eiweiß, im Filtrate lassen sich keine Spaltungsprodukte nachweisen
d)	29./III. 05	74 „	65° 51′ 30″	„	

2. Versuch.

25 ccm dialysierten Rinderserums mit 25 ccm 0,8proz. Sodalösung und 0,3 g Trypsin Grübler werden der Verdauung bei Bruttemperatur ausgesetzt und in gewohnter Weise untersucht. Ablesungstemperatur 24,8 bis 24,9°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	22./II. 05 6h abends	Entnahme sofort nach Herstellung der Lösung	65° 54′	1,339536	
b)	24./II. 05 11h vormittags	17 Stunden	65° 52′ 30″	1,339657	Massenhaft koagulables Eiweiß
c)	25./II. 05 12h mittags	42 „	65° 53′ 30″	1,339576	
d)	28./II. 05 12h mittags	6 Tage	65° 54′	1,339536	Massenhaft koagulables Eiweiß
e)	29./II. 05 12h mittags	7 „	65° 54′	„	Die Menge des koagulablen Eiweißes ist unverändert

Die beiden Versuche zeigen übereinstimmend, daß in dem einen Falle während 74tägiger Verdauung, in dem anderen während 7tägiger Verdauung keine Änderung der refraktometrischen Werte, ebensowenig wie eine Änderung des Bestandes an koagulablem Eiweiß eingetreten ist.

Ein mit nativem Eierklar angestellter analoger Versuch hatte das gleiche Resultat.

Wir haben es hier in beiden Fällen mit der bekannten Resistenz der Blutsera gegenüber Trypsinwirkung zu tun. Diese sogenannte antifermentative Wirkung kann auf diese Weise ungemein schön demonstriert werden und es hat uns die hier

eingeschlagene Methode in sehr exakter Weise erlaubt, die bisher völlig dunkle Wirkungsweise dieses Antifermentes auf das Trypsin näher zu untersuchen, worüber wir demnächst gesondert berichten wollen.

Wir möchten außerdem nur kurz darauf verweisen, daß die beiden Versuchsreihen gegenüber den später anzuführenden als weitere Kontrollversuche verwendet werden können.

II. Trypsinwirkung auf dialysiertes und inaktiviertes Rinderserum.

Gegen Hochquellwasser dialysiertes Rinderserum wurde vom 9. I. bis 5. II. gegen destilliertes Wasser dialysiert und durch Erhitzen auf etwa 80° inaktiviert. Dieses Serum wurde mit dem gleichen Volumen 0,8 proz. Sodalösung verdünnt und nach Zusatz von 0,2 g Trypsin unter Toluol in den Brutschrank gebracht.

Die entnommenen Proben wurden bei 24,7 bis 24,8° bestimmt.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsexponent	Anmerkung
a) 7./II. 11h mittags	Sofort nach Aufstellung der Lösung entnommen	66° 37′	1,336097	
b) 8./II. 11h mittags	24 Stunden	66° 35′	1,336255	Reichlich koagulables Eiweiß
c) 11./II. 11h mittags	4 Tage	66° 35′	„	
d) 16./II. 11h mittags	9 „	66° 35′	„	Reichlich koagulables Eiweiß, keine Albumosen u. Peptone. Filtrat d. Gerbsäurefällung gibt reichl. Phosphorwolframsäurefällung
e) 24./II. 11h mittags	17 „	66° 34′ 30″	1,336294	

Man ersieht aus diesem Versuche, daß bereits nach 24 stündiger Verdauungsdauer der Brechungsexponent merklich erhöht ist, um sich durch längere Zeit entsprechend dem geringen Fortschritte der Verdauung auf gleicher Höhe zu halten. Der Versuch zeigt aber auch, daß das inaktivierte Serum noch immer große Trypsinfestigkeit besitzt wie dies auch aus den Untersuchungen von Oppenheimer und Aron[33]) hervorgeht.

Wir haben daher unsere Versuche an geeigneterem Materiale wiederholt.

III. Trypsinwirkung auf natives Pferdeserum.

Pferdeserum mit gleichem Volumen 0,8 proz. NaCl-Lösung verdünnt, als auch unverdünnt, hatte sich in Vorversuchen als wenig trypsinfest erwiesen.

Es wurden dementsprechend zwei Versuche aufgestellt, in denen einmal unverdünntes, das anderemal mit Kochsalz zur Hälfte verdünntes

Pferdeserum mit je 0,2 g Trypsin und entsprechender Sodamenge zur Verwendung gelangte.

Die Versuche ergaben bei 24,8°:

1. Unverdünntes Serum.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	10./IV. 05 10h abends	Sofort nach der Herstellung entnommen	63° 31′	1,351484	
b)	12./IV. 05 11h vormittags	37 Stunden	63° 25′ 30″	1,351974	Der größte Teil des Eiweißes ist nicht mehr koagulabel

2. Verdünntes Serum.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
c)	10./IV. 9h abends	Sofort nach der Mischung entnommen	65° 10′	1,34314	
d)	12./IV. 10h vormittags	37 Stunden	65° 7′	1,343389	
e)	13./IV. 7h abends	70 „	65° 5′	1,343555	Derselbe Befund wie oben

In beiden Fällen hat der Brechungsexponent relativ bedeutend zugenommen, in dem einen Falle um 49 Einheiten, in dem andern um 41,5 Einheiten der 4. u. 5. Dezimale, wiewohl noch immer nicht alle koagulierbare Substanz aufgespalten worden war.

IV. Trypsinwirkung auf Eierklar und kristallisiertes Ovalbumin.

1. Versuch mit Eierklar.

Um Eierklar seiner Trypsinfestigkeit zu berauben, wurde das aus zwei Eiern gewonnene Eiweiß mit dem gleichen Volumen destillierten H_2O verdünnt, vorsichtig mit Essigsäure angesäuert, von dem ausgefallenen Ovomucin abfiltriert und das Filtrat durch Zusatz von Soda auf einen Gehalt von 0,4 Proz. gebracht. In 55 ccm dieser Lösung wurden 0,5 g Trypsin gelöst und die Flüssigkeit bei Bruttemperatur der Verdauung überlassen. Die entnommenen Proben wurden bei 24,8° refraktometrisch bestimmt.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index
a)	25./II. 12h mittags	sofort nach der Aufstellung entnommen	64° 45′	1,34522
b)	28./II.	3 Tage	64° 39′	1,345723

Die in 3 Tagen infolge der Verdauung eingetretene Erhöhung des Brechungsexponenten beträgt hier 50,3 Einheiten der beiden letzten Dezimalen.

2. Versuch mit kristallisiertem Ovalbumin.

Zweimal umkristallisiertes und behufs Entfernung von Ammonsulfat dialysiertes Ovalbumin wird mit Soda alkalisch gemacht, so daß die Lösung 0,4 Proz. Soda enthält und 15 ccm dieser Lösung werden mit 0,2 g Trypsin

Grübler versetzt und bei 37° verdauen gelassen. Die entnommenen Proben werden bei 24,9° bestimmt und zeigen folgendes:

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	14./II. 05 6h abends	Entnahme unmittelbar nach dem Fermentzusatz	65° 54′ 30″	1,339495	
b)	15./II. 05 6h abends	24 Stunden	65° 47′ 30″	1,340062	
c)	18./II. 05 11h vormittags	4 Tage	65° 48′	1,340022	Spuren koagulierbaren Eiweißes, keine Albumosen, reichliche Fällung mit Tanninessigsäure und in deren Filtrat mäßige Phosphorwolframsäurefällung. Wurstersche Chinonreaktion positiv

Innerhalb 24 Stunden schnellt der Brechungsexponent in die Höhe, ohne sich im weiteren Verlaufe der Verdauung zu ändern. Die Zunahme des Brechungsexponenten beträgt 52,7 Einheiten der beiden letzten Dezimalen.

V. Trypsinwirkung auf Wittepepton.

1. Versuchsreihe. Stundenversuch.

20 ccm 10 proz. Wittepeptonlösung werden mit dem gleichen Volumen 0,8 proz. Sodalösung und 0,2 g Trypsin versetzt. Von dieser Mischung wird zur sofortigen Bestimmung eine Probe entnommen und die restliche Flüssigkeit zum Teil in ein bei 40° reguliertes Wasserbad eingestellt, zum Teil bei Zimmertemperatur belassen. Temperatur der Bestimmungen 25°.

a) Bei Bruttemperatur gehaltene Verdauungslösung.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
a)	3./II. 05 10h 41′ vormittags	sofort nach der Herstellung entnommen	65° 15′ 30″	1,342689	
b)	3./II. 05 11h 15′ vormittags	34 Minuten	65° 14′ 30″	1,342771	Keine primären Albumosen mehr nachweisbar
c)	3./II. 05 11h 45′ vormittags	1 Stund. 4 Min.	65° 13′ 30″	1,342853	
d)	3./II. 05 12h 45′ nachmittags	2 „ 4 „	65° 13′	1,342894	Bei voller Sättigung mit Ammonsulfat nur Spuren von Albumosen aussalzbar
e)	3./II. 05 1h 45′ nachmittags	3 „ 4 „	65° 12′	1,342976	
f)	3./II. 05 4h 45′ nachmittags	6 „ 4 „	65°11′30″65°12′	1,342986	Keine Albumosen mehr nachweisbar, mit Tannin reichliche Fällung
g)	4./II. 05 11h vormittags	24 „ 19 „	65° 9′ 30″	1,34318	

b) Die bei Zimmertemperatur gehaltene Verdauungslösung.

a)	3./II. 10h 41′ vormittags	sofort nach der Herstellung entnommen	65° 15′ 30″	1,342689	
b)	3./II. 11h 11′ vormittags	30 Minuten	65° 14′ 30″	1,342771	Keine primären, nur mäßige Mengen von Deuteroalbumosen
c)	3./II. 4h 11′ nachmittags	5 Stund. 30 Min.	65° 10′	1,34314	
d)	4./II. 11½h vormittags	24 „ 49	65° 7′	1,343389	

Beide Versuche zeigen, daß zwischen der Einwirkung der tryptischen und der peptischen Verdauung ein großer Unterschied besteht.

Bei tryptischer Verdauung ist bereits nach ½ Stunde, ja sogar, wie ein dritter Versuch uns lehrte, nach ¼ Stunde ein deutlicher Ausschlag im Sinne der Erhöhung der Brechung zu verzeichnen, der allmählich zunimmt. Die Erhöhung der Refraktion betrug in dem einen Falle 49,1, in dem anderen 70 Einheiten der 4. u. 5. Dezimalstelle.

Bemerkenswert erscheint, daß die tryptische Wirkung bei Zimmertemperatur ebenso kräftig ist, wie bei Bruttemperatur. Wir sahen binnen zwei Tagen in Proben, die bei Zimmertemperatur der Trypsinwirkung ausgesetzt waren, reichliche Mengen Tyrosins sich ablagern. Die primären Albumosen schwinden bereits innerhalb der ersten halben Stunde nahezu völlig, die sekundären Albumosen zum größten Teile bereits nach 2 Stunden.

2. Versuchsreihe.

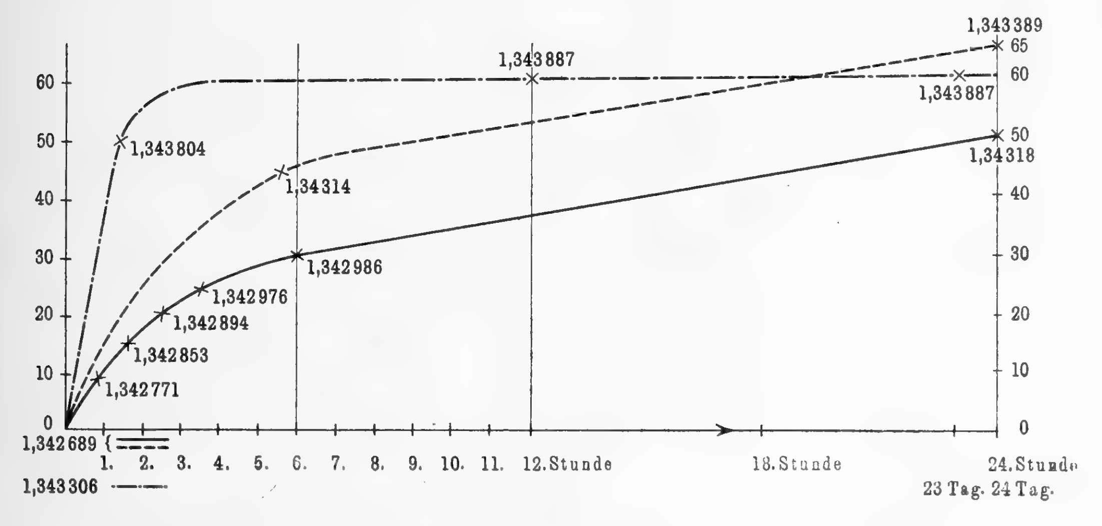
200 ccm Verdauungsflüssigkeit wurden in der Weise hergestellt, daß 100 ccm 10proz. Wittepeptonlösung mit dem gleichen Volumen 0,8proz. Sodalösung verdünnt und mit 2 g Grüblerschen Trypsins versetzt wurden. Das Ganze wurde klar filtriert und 50 ccm sofort über der Flamme erhitzt. Der Rest wurde derart verarbeitet, daß ein Teil einer kurzdauernden, ein zweiter Teil einer länger dauernden Verdauung im Brutschrank ausgesetzt wurde.

Um die durch das Trypsin herbeigeführten Änderungen genau verfolgen zu können, wurde am Schluß des Versuches jede der Lösungen der fraktionierten Fällung mit Zinksulfat, Gerbsäure und Phosphorwolframsäure unterzogen. Die Zinksulfatfällung wurde stets in einer besonderen Portion vorgenommen.

Die auf die Polypeptidfraktion entfallenden Werte wurden wie bei den Pepsinversuchen durch Subtraktion der Werte für den Tannin- und Zinksulfatniederschlag gewonnen, wobei die unmittelbar nach der Mischung erhitzte Probe die Kontrollzahlen lieferte. Temperatur der Bestimmungen 24,8°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Ferment-wirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-exponent	Anmerkung
a)	28./II. 9h abends	Sofort nach Fermentzusatz entnommen	65° 8′	1,343306	
b)	1./III. 11h mittags	16 Stunden	65° 2′	1,343804	
c)	11./III. 12h mittags	11 Tage	65° 1′	1,343887	
d)	23./III.	23 „	65° 1′	1,343887	Durch Salzsättigung mit Ammonsulfat bei saurer Reaktion keine Albumosen nachweisbar

Wir sehen, daß die bedeutendsten Veränderungen im Brechungsvermögen innerhalb der ersten Stunden eintreten und daß dann selbst die durch Wochen fortgesetzte Verdauung den Brechungsexponenten nur unwesentlich zu beeinflussen vermag. Stellt man die Ergebnisse der letzten Versuchsreihen derart graphisch dar, daß man die Verdauungszeiten auf die Abszissenaxe, die zugehörigen Brechungsexponenten auf die Ordinatenaxe aufträgt, so ergeben sich folgende Kurven.



Die durchgezogene Kurve bezieht sich auf den Stundenversuch 1 a; die gestrichelte auf den Stundenversuch 1 b, während die gestrichelt-punktierte Kurve dem Versuche 2 angehört. Die auf der Abszissenaxe verzeichneten Zahlen bedeuten Tage.

Man sieht ohne weiteres, daß die Zunahme des Brechungsvermögens entsprechend einer hyperbelartigen Kurve verläuft, die zu Beginn der Verdauung steil ansteigt, um sehr bald einen Ruhepunkt zu gewinnen.

Bei weiterem Studium wird sich zeigen müssen, ob diese bei zahlreichen anderen Versuchen stets beobachtete Erscheinung als Gesetz aufzufassen ist.

Über das quantitative Verhältnis der gebildeten Spaltungsprodukte geben die nachfolgenden Analysen einen Überblick.

Sie wurden ausgeführt: 1. Mit 50 ccm der sofort nach Zusatz von Trypsin entnommenen gekochten Probe; diese Zahlen ermöglichen daher einen Vergleich mit ungespaltenem Wittepepton. 2. Mit 50 ccm der nur 16 Stunden verdauten Wittepeptonlösung vom Expon. 1,343804 und endlich 3. mit 56 ccm der bis zum 13. III. verdauten Lösung vom Expon. 1,343887.

		Albumosen-N	Polypeptid-N	Peptone und Basen	Aminosäuren	Gesamt-N
I. Wittepepton mit Trypsin gekocht	Gramm N	0,2948 g	0,0468 g	0,02799 g	0,06705 g	0,43664 g in 50 ccm
	Proz. des Gesamt-N	67,5 Proz.	10,7 Proz.	6,4 Proz.	15,3 Proz.	99,9 Proz.
II. Wittepepton nach 16stündiger Trypsinverdauung	Gramm N	0,02468 g	0,06038 g	0,12582 g	0,2247 g	0,43548 g in 50 ccm
	Proz. des Gesamt-N	5,6 Proz.	13,8 Proz.	28,9 Proz.	51,5 Proz.	99,8 Proz.
III. Wittepeptonlösung nach 23tägiger Trypsinverdauung	Gramm N	0	0,0791 g	0,07035 g	0,3612 g	0,51065 g in 56 ccm
	Proz. des Gesamt-N	0	15,5 Proz.	13,7 Proz.	70,7 Proz.	99,9 Proz.

Es war sonach, wie die Tabelle zeigt, bereits nach 16 Stunden der größte Teil des Wittepeptons einer ganz bedeutenden Umwandlung unterlegen*), die namentlich die Albumosen, Aminosäuren und Pepton-Basenfraktion betrifft, während die Gerbsäurefällung abiureter Körper nur langsam zunahm; in dieser Phase erfolgt die bedeutendste Zunahme des Brechungskoeffizienten. Doch ist damit die Trypsinwirkung bei weitem nicht erschöpft. Wir sehen vielmehr, daß vom 1. III. bis 23. III. noch ganz bedeutende Wandlungen stattgefunden haben, insbesondere in der Peptonbasen- und der Aminosäurengruppe. Trotzdem ist eine weitere Änderung des Brechungsexponenten nahezu ausgeblieben. Es haben sich also die meisten Vorgänge, welche geeignet sind, die Erhöhung des Brechungsexponenten herbeizuführen, bereits in den ersten Stunden der Fermentwirkung abgespielt und die restlichen Körper, welche etwa bei genügender Konzentration einen Einfluß auf den Brechungsexponenten ausüben könnten, sind in zu ge-

*) Die ausführliche Diskussion der hier angegebenen analytischen Daten und der für die Eiweißspaltung sich daran knüpfenden Ergebnisse behalten wir uns noch vor.

ringer Menge vorhanden, um diesen geltend zu machen; die weitere Umwandlung betrifft ausschließlich Prozesse, welche das optische Gleichgewicht nicht zu stören vermögen.

Dies scheint jedoch nicht allein an dem Verschwinden der Albumosen, welche im Verlaufe der 16stündigen Verdauung allerdings die gewaltigste Veränderung (von 67,5 Proz. auf 5,6 Proz.) erfahren haben, oder anderer bekannter Derivate gelegen zu sein, wie sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus später angeführten Versuchen ergibt. Vielmehr ist daran zu denken, daß das „Trypsin" — richtiger eine darin enthaltene bestimmte Fermentkomponente — neben der dem Pepsin entsprechenden hydrolytischen Spaltung noch eine weitere tiefergehende, „konstitutive" Veränderung veranlaßt, als deren Ausdruck die Erhöhung des Brechungsvermögens anzusehen wäre.

Die Empfindlichkeit, mit welcher die konstitutiven Unterschiede, auf welche unsere Differenzen hinweisen, angezeigt werden, waren wir bei unserem Materiale aus naheliegenden Gründen nicht in der Lage zu prüfen. Sie geht aber zur Genüge aus den an anderen Materialien gewonnenen Erfahrungen der Autoren hervor. Doch versuchten wir es, in den nachfolgenden Untersuchungen uns über die Abhängigkeit des Ausschlages von dem Verdünnungsgrade des Wittepeptons, da die Größe des Brechungsvermögens mit der Verdünnung abnimmt, als auch von der Fermentmenge zu orientieren.

3. Versuchsreihe.

Einfluß der Verdünnung des Wittepeptons bei gleicher Fermentmenge der Verdauungsgemische auf den Brechungsindex.

10 proz. Wittepeptonlösung wurde soweit mit Wasser verdünnt, daß stets bei gleichem Volumen (30 ccm), bei gleichem Soda- (0,4 Proz.) und Trypsingehalt (0,3 g) die Lösung 10, 5, $2^1/_2$, 1 und 0,5 Proz. an Wittepepton enthielt.

Die Lösungen wurden sofort nach Herstellung und hierauf nach 24 stündigem Aufenthalte im Brutschrank untersucht. Ablesung bei 24,9°.

1. 10 proz. Wittepeptonlösung.

	Brechungswinkel	Brechungsindex	Erhöhung d. Brechungsexponenten um:
Vor der Fermentwirkung	63° 20′	1,35243	64,5
Nach 24 stündiger Fermentwirkung	63° 12′ 30″	1,353075	

2. 5proz. Wittepeptonlösung.

	Brechungswinkel	Brechungsindex	Erhöhung d. Brechungsexponenten um:
Vor der Fermentwirkung	65° 5′	1,343555	41,5
Nach 24stündiger Fermentwirkung	65° 00′	1,34397	

3. 2,5proz. Wittepeptonlösung.

Vor der Fermentwirkung	65° 59′	1,339131	16,2
Nach 24stündiger Fermentwirkung	65° 57′	1,339293	

4. 1proz. Wittepeptonlösung.

Vor der Fermentwirkung	66° 30′ 30″	1,33661	8
Nach 24stündiger Fermentwirkung	66° 29′ 30″	1,33669	

5. 0,5proz. Witte peptonlösung.

Vor der Fermentwirkung	66° 43′	1,335623	4
Nach 24stündiger Fermentwirkung	66° 42′ 30′ 66° 43′	1,335662	
Nach 29tägiger Fermentwirkung	66° 42′ 30″	1,335662	

Man ersieht aus dem Angeführten, daß die Erhöhung des Brechungsindex mit der Konzentration steigt, bei verdünnten Lösungen kleiner wird und bereits bei einer 1proz. Wittepeptonlösung nur sehr gering ist; an einer ½proz. Wittepeptonlösung ist selbst nach mehrwöchentlicher Trypsineinwirkung kein Einfluß auf die Brechung mehr erkennbar.

4. Versuchsreihe.

Einfluß der Fermentmenge auf den Brechungsindex der Verdauungsgemische.

Zu je 40 ccm 5proz. Wittepeptonlösung von 0,4proz. Gehalt Soda werden 0,1 g, 0,05 g und 0,025 g Trypsin gesetzt, die Lösungen klar filtriert und sowohl unmittelbar nach der Herstellung, als nach 24stündiger Einwirkung bei 40° geprüft.

Ablesungstemperatur 24,9°.

Trypsin-gehalt	Dauer der Fermentwirkung	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Erhöhung des Brechungs-index
0,1 g	Vor der Fermentwirkung	65° 21′	1,342237	41,1
	Nach 24stündiger Fermentwirkung	65° 16′	1,342648	
0,05 g	Vor der Fermentwirkung	65° 24′	1,341988	29,1
	Nach 24stündiger Fermentwirkung	65° 20′ 30″	1,342279	
	Nach 48stündiger Fermentwirkung	65° 20′	1,34232	
0,025 g	Vor der Fermentwirkung	65° 13′ 30″	1,342853	16,4
	Nach 24stündiger Fermentwirkung	65° 11′ 30″	1,343017	

Es zeigt sich somit, daß auch mit der Verminderung der Konzentration des Trypsins bei gleichbleibender Konzentration der Eiweißlösung in gleichen Zeiten die Wirkung abnimmt; man hat darin ein bequemes neues Maß der Trypsinmenge, das für schätzungsweise Messungen innerhalb bestimmter Grenzen zulässig sein dürfte.

VI. Trypsin-Wirkung auf Eiweißfraktionen und einzelne Körper.

Hatte sich bisher die Erhöhung des Brechungsexponenten als eine konstante Eigenschaft der Trypsinwirkung erwiesen, so war es von größtem Interesse, festzustellen, ob sich die Abhängigkeit dieser Wirkung von bestimmten Körpern des Verdauungsgemisches nachweisen ließe.

Wir unterwarfen daher zunächst die einzelnen Fraktionen des Wittepeptons gesondert der tryptischen Wirkung und gingen dann zu einem einfacheren Körper über, welcher der Einwirkung des Trypsins noch unterliegt, der Curtiusschen Base, ferner zu Glycylglycin, Hippursäure, Glykokoll, Alanin und Piperazin.

Polypeptide, welche nach den Angaben von E. Fischer und Abderhalden[35]) von dem Pankreassaft gespalten werden und deren refraktometrische Untersuchung bei der fermentativen Spaltung nicht aussichtslos scheint, standen uns leider nicht zur Verfügung.

1. Trypsinwirkung auf Albumosen.

Aus einer größeren Menge Wittepepton wird durch Aussalzen mit festem Ammonsulfat das Albumosengemenge dargestellt und in 5 proz. Lösung nach Soda- und entsprechendem Trypsinzusatz der Verdauung ausgesetzt. Die Bestimmungen erfolgten bei 24,9°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a)	3./IV. 05 6h abends	Sofort nach Herstellung der Lösung entnommen	65° 9′	1,343223	
b)	4./IV. 05 11h vormittags	17 Stunden	65° 6′	1,343482	
c)	5./IV. 05 12h mittags	42 "	65° 4′ 30″	1,343596	
d)	6./IV. 05 11h vormittags	65 "	65° 3′ 30″	1,343649	Die Albumosen sind nahezu völlig verschwunden

Ähnlich wie mit Ammonsulfat gefällte Albumosen verhielten sich auch die nach Zinksulfatsättigung bei saurer Reaktion aus Wittepepton dargestellten.

In der so erhaltenen Albumosenlösung wurde das anhaftende Zink mit phosphorsaurem Natron entfernt, bis keine Reaktion mit Schwefelammon mehr eintrat. 50 ccm dieser Lösung, die einen N-Gehalt von 0,1428 g hatte, also eine etwa 1,8—2 proz. Lösung darstellte, wurden mit Soda und 0,2 g Trypsin der Verdauung überlassen.

Ablesungstemperatur 24,9°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentmenge	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a)	18./III. 05 11h vormittags	Sofort nach der Mischung entnommen	65° 49′ 30″	1,33990	Der Brechungsexponent bleibt innerhalb der ersten Stunde konstant, die primären Albumosen sind völlig verschwunden
b)	18./III. 05 6h abends	7 Stunden	65° 49′	1,339941	Bei ganzer Sättigung mit Ammonsulfat nur Ausfallen von Schlieren
c)	19./III. 05 11h vormittags	24 "	65° 47′ 30″	1,340062	
d)	20./III. 05 11½h vormitt.	48½ "	65° 47′ 30″	"	Enthält keine Albumosen, gibt mit Tanninessigsäure, sowie Phosphorwolframsäure reichliche Niederschläge
e)	23./III. 05 12h mittags	5 Tage	65° 47′ 30″	"	

Es wurden, wie man sieht, in beiden Fällen die Brechungsexponenten erhöht und zwar etwa in gleicher Weise, wie bei

reinen Wittepeptonlösungen. Im zweiten Versuch war entsprechend der geringen Konzentration der Lösung die Beeinflussung des Brechungsindex eine kleinere, etwa entsprechend dem Versuch V, 3 mit 2,5 proz. Wittepeptonlösung.

2. Trypsinwirkung auf das mit Tannin nicht fällbare Gemisch von Peptonen, Basen und Aminosäuren.

400 ccm 10 proz. Wittepeptonlösung wurden mit Essigsäure schwach angesäuert und mit etwa 800 ccm 10 proz. Gerbsäurelösung gefällt, der Tanninniederschlag absitzen gelassen und das klare mit Tannin in saurer Lösung nicht mehr fällbare Filtrat mit Natronlauge vorsichtig neutralisiert und von dem hierbei entstehenden Niederschlag abermals abfiltriert.

In dieser Flüssigkeit wird das Tannin durch Eintragen von festem Barythydrat, der überschüssige Baryt durch Schwefelsäure entfernt; die so erhaltene Lösung wird auf dem Wasserbade bei neutraler Reaktion bis auf 25 ccm eingeengt; dieselbe gibt mit Tanninessigsäure keine Fällung, wohl aber mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure einen reichlichen Niederschlag; sie gibt ferner eine schöne rotviolette Biuretreaktion und die Wurstersche Chinonreaktion.

Die Flüssigkeit wird nunmehr mit Soda und 0,2 g Trypsin der Verdauung im Brutschrank überlassen.

Temperatur der Bestimmungen 24,9°.

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a)	18./III. 05 6h 55′ abends	Sofort nach der Herstellung der Lösung	65° 4′ 30″	1,343596	
b)	19./III. 05 11½h vormitt.	16 Stdn. 35′	65° 3′	1,34372	
c)	20./III. 05 11h vormittags	40 „ 35′	65° 2′	1,343804	
d)	21./III. 05 11h vormittags	64 „ 35′	65° 2′ 30″	1,343762	
e)	29./III. 05 12h mittags	11 Tage	65° 1′ 30″	1,343845	Biuretreaktion negativ
f)	29./IV. 05 12h mittags	42 „	64° 59′	1,344053	

Wir sehen, daß eine sehr bedeutende Erhöhung des Brechungsexponenten, nämlich um 45,7 der 4. und 5. Dezimalstelle eingetreten ist. Da es sich um ein Gemenge von Peptonen, Diaminosäuren und Aminosäuren handelt, kann natürlich nicht entschieden werden, welcher von den drei Körperklassen oder ob allen zusammen die Wirkung auf den Brechungsindex zukommt; doch scheint es am wahrscheinlichsten, daß den kompliziert gebauten und der Trypsinwirkung wohl zugänglichen Peptonen der Hauptanteil zukommt.

3. Trypsinwirkung auf die tanninfällbare, abiurete Fraktion des Wittepeptons (Polypeptide).

20 g Wittepepton werden in 10 proz. Lösung mit 1 g Trypsin Grübler vom 2. IV. bis 6. IV. 05 im Brutschrank verdaut, bis alle Albumosen völlig verschwunden sind; hierauf wird die Flüssigkeit bei essigsaurer Reaktion mit 10proz. Tanninlösung gefällt, der Niederschlag absitzen gelassen, die überstehende Lösung abgegossen, der Bodensatz mit Wasser biuretfrei gewaschen und endlich in Natronlauge gelöst. Aus der tiefdunklen Flüssigkeit wird durch Eintragen von Baryumoxydhydrat das Tannin und durch Schwefelsäure der Baryt entfernt.

Die klare, leicht gelblich gefärbte Lösung beträgt 120 ccm und enthält in 25 ccm 0,0276 g N; sie wird durch Einengen auf das fünffache konzentriert, so daß die Lösung die Konzentration einer 3 bis 4proz. Wittepeptonlösung besitzt. Sie gibt keine Biuretreaktion, keine Chinonreaktion, fällt dagegen mit Tanninessigsäure, sowie mit Phosphorwolframsäure.

Diese Flüssigkeit wird mit 0,1 g Trypsin Grübler und mit Soda der Verdauung ausgesetzt.

Die bei 24,9° ausgeführten Bestimmungen ergeben:

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) 29./IV. 05 6^h abends	Unmittelbar nach der Mischung entnommen	63° 10′	1,35329
b) 1./V. 05 11^h vormitt.	39 Stunden	63° 9′	1,353377
c) 3./V. 05 11^h „	$4^1/_2$ Tage	63° 7′ 30″	1,353507
d) 23./V. 05 10^h „	24 Tage	63° 5′	1,353725

Die Erhöhung des Brechungsexponenten nimmt sowohl hier, wie in einem anderen mit verdünnter Lösung ausgeführten Versuch einen etwas langsameren Verlauf, wie bei der Wittepeptonlösung. Doch ist die Erhöhung im ganzen eine nicht geringere: 42,5 Einheiten der 4. und 5. Dezimale.

Wir müssen daraus schließen, daß diese Fraktion, die wir vorläufig als Polypeptidfraktion bezeichnen, in nicht geringer Menge biuretfreie Substanzen enthält, welche der Trypsineinwirkung zugänglich sein müssen, neben solchen, die, wie aus Fischers und Abderhaldens[35a]) Untersuchungen hervorgeht, trypsinfest sind.

4. Trypsinwirkung auf peptisch weit abgebaute Verdauungsprodukte.

Es war von Interesse, wie sich das Brechungsvermögen ändern würde, wenn eine durch längere Zeit einer intensiven Pepsinwirkung ausgesetzte und im optischen Gleichgewichte gebliebene Lösung der tryptischen Wirkung unterworfen würde.

Da wir nach den bisherigen Erfahrungen unter den Eiweißspaltungsprodukten des Pepsins und Trypsins nur einen quantitativen, aber nicht einen qualitativen Unterschied kennen, so konnte erwartet werden, daß die weit aufgespaltene Pepsinverdauungslösung die meisten Umlagerungen, welche das Trypsin sonst herbeiführt, bereits durchgemacht hätte, wenn auch in quantitativ geringerem Umfange, und daß der Ausschlag auf den Brechungsexponenten etwa so gering wäre, wie beim Übergange der kurzdauernden in die langdauernde Trypsinverdauung.

Zu diesem Zweck wurde daher das Rinderserum, welches unter der Wirkung des Pepsin Fairchild vom 20. I. bis 20. III. derart abgebaut worden war, daß keine Albumosen, wohl aber reichlich Polypeptide, Peptone, Basen und Aminosäuren vorhanden waren (siehe Analyse Seite 345), und das im ganzen Verlaufe unveränderte Refraktion gezeigt hatte, am 20. III. auf 0,4 proz. Sodagehalt gebracht und mit Trypsin weiter verdaut.

Die refraktometrischen Bestimmungen, bei 24,9° ausgeführt, zeigen folgendes:

	Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
a)	20./III. 1h mittags	Sofort nach der Mischung entnommen	65° 00′	1,34397	
b)	20./III. 9h abends	8 Stunden	64° 59′	1,344053	
c)	21./III. 11h vormittags	21 „	64° 58′	1,344136	
d)	29./III. 12h mittags	9 Tage	64° 55′ 30′	1,34436	Gibt einen viel geringeren Tanninniederschlag als die Kontrollprobe mit Pepsin; in der Kälte scheidet sich reichlich Tyrosin aus.

Die Erhöhung des Brechungsexponenten beträgt also 39 Einheiten der beiden letzten Dezimalen und zeigt, daß nach zweimonatlicher peptischer Verdauung, welche den Exponenten unbeeinflußt ließ, bereits eine 9tägige Trypsinverdauung eine wesentlich andere Brechung bedingt.

Wie sich aus einem Vergleich der quantitativen Verhältnisse der Pepsin- und Trypsinspaltung nach unseren Untersuchungen ergibt, werden bei protahierter Pepsinspaltung hauptsächlich die tanninfällbaren abiureten Stoffe angereichert und zwar, wie es aus den Befunden von Zunz[31]) hervorzugehen scheint, auf Kosten der Aminosäurenfraktion; bei der Trypsinspaltung dagegen bleiben sowohl diese, wie auch die Basen und Peptone hinter der bei weitem

am mächtigsten anwachsenden Aminosäurenfraktion ungemein zurück; es liegt darin ein prinzipieller Gegensatz in der Wirkungsweise der beiden proteolytischen Fermente. Die vorliegenden Erfahrungen reichen aber nicht aus für die Annahme, daß auch der Unterschied des refraktometrischen Verhaltens darin seine Erklärung finden könnte.

5. Trypsinwirkung auf abiurete Säurespaltungsprodukte des Wittepeptons.

Haben wir im vorhergehenden Versuche die Kombination zweier Fermentwirkungen auf das Brechungsvermögen geprüft, so blieb noch übrig, die durch vorherige energische Säurespaltung erzeugten Endprodukte der tryptischen Wirkung zu unterwerfen, vor allem, um zu untersuchen, ob der Endzustand, der durch dieses bei weitem eingreifendere Verfahren herbeigeführt wird, noch der tryptischen Wirkung zugänglich ist.

10 g Wittepepton wurden mit 100 ccm 5proz. Schwefelsäure mehrere Tage über freier Flamme unter Rückflußkühlung gekocht, bis die Flüssigkeit keine oder nur eine äußerst schwache Biuretreaktion gab; aus diesem Säuregemisch wurde die Schwefelsäure mit Baryt ausgefällt. 40 ccm der Lösung, die noch reichlich mit Tanninessigsäure fiel, wurden mit Soda alkalisch gemacht, mit 0,4 g Trypsin verdaut und in einzelnen Proben bei 24,9° refraktometrisch untersucht.

Die Flüssigkeit hatte einen Stickstoffgehalt von 0,75 Proz.

Entnahme der Probe	Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) 6./IV. 05 11h vormittags	Sofort nach dem Fermentzusatz entnommen	64° 57′ 30″	1,344177
b) 7./IV. 05 11h "	24 Stunden	64° 57′ 30″	"
c) 10./IV. 05 12h "	4 Tage	64° 56′ 30″ – 64° 57′	1,344219
d) 13./IV. 05 7h abends	7 "	64° 57′ 30″	1,344177
e) 29./IV. 05 12h "	23 "	64° 55′ 30″	1,344343
f) 1./V. 05 11h vormittags	25 "	64° 55′	1,344385
g) 3./V. 05 12h "	27 "	64° 55′ 30″	1,344343
h) 23./V. 05 11h "	47 "	64° 50′ 30″	1,344759

Man sieht, daß innerhalb 47 Tagen der Brechungsindex um 58,2 Einheiten der letzten Dezimalen zugenommen hat.

Betrachtet man jedoch den Gang der Zunahme, so ersieht man, daß er ein ganz anderer ist, als wir es bisher bei tryptischer

Einwirkung sahen. In den ersten 7 Tagen blieb der Brechungsexponent völlig konstant und erfuhr erst nach dieser Zeit eine allmähliche Zunahme. Die Kurve, die sich dabei ergeben würde, wäre von der bisher charakteristischen weit verschieden.

Versuchsfehler, die etwa durch Entweichen von Gasen oder Verdunstung der Flüssigkeit herbeigeführt werden können, waren ausgeschlossen, ganz abgesehen davon, daß selbst geringe Mengen von Ammoniak, wie sie bei der Trypsinverdauung in alkalischer Lösung leicht entweichen, auf den Brechungsexponenten, wie uns 6 bis 8 wöchentliche Kontrollversuche lehrten, keinen Einfluß ausüben.

Es muß jedoch offen gelassen werden, ob die beobachtete Zunahme des Brechungsexponenten auf die tryptische Wirkung direkt zu beziehen ist, oder ob es sich nicht vielmehr um sekundäre Veränderungen handelt, welche unabhängig von der Trypsinwirkung auftreten. Wir ersehen aus den im folgenden ausgeführten Versuchen, daß auch bei der Spaltung der Curtiusschen Base analoge Verhältnisse vorliegen und möchten an dieser Stelle auch darauf hinweisen, daß Reiß bei seinen Untersuchungen über den Brechungsexponenten einzelner Eiweißkörper des Blutserums die merkwürdige Tatsache fand, daß die durch Salzfällung gewonnenen Fraktionen des Blutserums für sich einen bedeutend höheren Brechungsexponenten aufwiesen als das Gesamtserum.

6. Trypsinwirkung auf die Curtiussche Base und Glycylglycinester.

Schwarzschild[34]) hatte festgestellt, daß dieser Körper, der nach Curtius[34a]) eine Tetraglycylverbindung darstellt, unter Glykokollbildung von Trypsin gespalten wird. Es schien uns nun aussichtsvoll, gerade bei der Spaltung eines so einfachen Körpers, dessen Konstitution gut studiert ist, die tryptische Spaltung mittels des Refraktometers verfolgen zu können.

Das Präparat, das wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. L. Pollak verdanken, war nach den Angaben von Curtius aus salzsaurem Glykokolläthylester dargestellt und dürfte infolge längerer Aufbewahrung merkliche Mengen von Glycinanhydrid enthalten haben; die Substanz gab eine wunderschön rote Biuretreaktion, die sich gut von der blauvioletten Biuretreaktion unseres Trypsinpräparates unterscheiden ließ.

1. Versuch.

1,5 g Base wurde in 50 ccm 0,4proz. Soda gelöst, mit etwa 0,5 g Trypsin Grübler versetzt und von der völlig klaren Lösung wurde am 22. XII. 04 ein Teil in den Brutschrank und ein zweiter Teil in den Eisschrank nach vorheriger Bestimmung des Brechungsexponenten eingestellt. Ablesungstemperatur 24,6°.

Entnahme der Probe	Brechungs-winkel	Brechungs-exponent	Anmerkung
22./XII. 04	65° 45′	1,340265	
2./I. 05 Im Brutschrank gehaltene Probe	65° 39′	1,340752	Probe nahezu abiuret
2./I. 05 Im Eisschrank gehaltene Probe	65° 46′	1,340184	Intensive Biuretreaktion

Hierauf wird die im Eisschrank gehaltene Probe behufs Zerstörung von Trypsin auf dem Wasserbade gekocht, am 4. I. abermals die Brechung bestimmt und die Probe in den Brutschrank eingestellt.

Es zeigt sich:

4./I. 05	65° 45′	1,340265
27./I. 05	65° 43′	1,340427

2. Versuch.

1 g der Base wurde wieder in 50 ccm 0,4 proz. Soda gelöst und mit 0,4 g Trypsin Grübler versetzt, ein Teil davon in den Brutschrank, ein anderer in den Eisschrank eingestellt und ein dritter auf dem Wasserbade gekocht und ebenfalls in den Brutschrank gestellt. Ablesungstemperatur 25°.

Entnahme der Probe	Brechungs-winkel	Brechungs-index	Anmerkung
9./I. Unmittelbar nach Ferment-zusatz	66° 26′	1,33697	
Die gekochte Probe	66° 25′ 30″ – 66° 25′	1,33705	
25./I. Die im Brutschrank ge-haltene ungekochte Probe	66° 22′	1,33729	Zeigt noch immer eine, wenn auch bedeutend schwächere Biuret-reaktion
26./I. Die im Brutschrank ge-haltene gekochte Lösung	66° 21′	1,33737	
25./I. Die in der Kälte gehaltene Probe	66° 28′ 30″	1,33677	
22./II. Die im Brutschrank ge-haltene native Probe	66° 20′	1,33745	Biuretreaktion nur spurenweise vorhanden

Auch ein dritter völlig analoger Versuch zeigte das gleiche Verhalten, nur mit dem Unterschiede, daß eine bedeutende Zunahme des Brechungsexponenten vor Verschwinden der Biuretreaktion nachgewiesen wurde.

Man ersieht aus beiden Versuchstabellen übereinstimmend, daß die durch längere Zeit bei Bruttemperatur gehaltenen Proben auch dann, wenn die Trypsinwirkung durch Erhitzen ausgeschaltet wurde, eine Erhöhung des Brechungsexponenten aufweisen. Es läßt dies jedenfalls auf sekundäre Umsetzungen schließen, die, wie sich aus der Curtiusschen[34a]) Arbeit ergibt, in mannigfachster Weise bei erhöhter, ja sogar bei Zimmertemperatur, so durch Abspaltung von Glycinanhydrid, eintreten können. Es konnte also auf diese Weise nicht entschieden werden, ob auch die bei der Trypsinwirkung sich einstellende Erhöhung des Brechungsexponenten tatsächlich auf der Spaltung durch das Ferment beruht.

Eine nach dem Vorgange von Schwarzschild[34]) vorgenommene Spaltung von 0,5 g Biuretbase mit 20 ccm 10proz. Schwefelsäure ergab denn auch in der Tat, daß durch $^1/_2$stündiges Kochen über der Flamme unter dem Rückflußkühler die Base völlig gespalten wurde — die Biuretreaktion war negativ — ohne daß eine Änderung des Brechungsexponenten eintrat; erst ein weiteres 8stündiges Kochen über der Flamme mit Rückflußkühler brachte eine Steigerung des Brechungsexponenten ND = 1,35561 auf ND = 1,356164.

Der den Glycylglycinester betreffende Versuch wurde derart angestellt, daß 1 g des reinen Präparates, das wir ebenfalls der Freundlichkeit des Herrn Dr. L. Pollak verdanken, in 40 ccm Wasser gelöst, die Flüssigkeit auf 0,4proz. Sodagehalt gebracht und nach Zusatz von 0,2 g Trypsin in den Brutschrank eingestellt wurde.

Ablesungstemperatur 24,9°.

Entnahme der Probe		Dauer der Fermentwirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
a)	19./IV. 05	Unmittelbar nach Fermentzusatz	66° 2′	1,33889
b)	28./IV. 05	9 Tage	66° 2′	"
c)	1./V. 05	12 "	66° 1′ 30″	1,33893
d)	23./V. 05	34 "	66° 0′ 30″	1,33901

Man sieht, daß die während 34tägiger Einwirkung des Trypsins herbeigeführte Änderung des Brechungsexponenten kaum die Fehlergrenzen der Methode überschreitet; in der Tat hat auch Glycylglycin bisher allen Versuchen, es mit Pankreassaft

analog dem Triglycylglycinester und dem Tetraglycylglycin zu spalten, widerstanden [E. Fischer und P. Bergell[34b]), E. Fischer und Abderhalden[35])].

Ebenso negativ wie beim Glycylglycinester fielen trotz 14 tägiger Trypsineinwirkung unsere Versuche mit Hippursäure aus, deren Spaltung durch Trypsin in Benzoesäure und Glykokoll, welche Nencki und Blank[36]) berichtet haben, von Gulewitsch[37]) und Schwarzschild[34]) geleugnet wird.

Es haben somit alle an Eiweiß oder dessen Derivaten mit Trypsin angestellten Versuche, bei denen eine Einwirkung des Fermentes auf das Substrat stattgefunden hat, übereinstimmend eine typisch verlaufende Erhöhung des Brechungsexponenten ergeben, so daß wir berechtigt zu sein glauben, dieselbe für das tryptische Ferment oder eines der Fermente des Pankreas als spezifisch anzusehen.

Es erübrigt noch anzuführen, daß wir auch mehrere Versuche mit Papayotinverdauung unternommen haben, ohne eine wesentliche Beeinflussung der Brechung wahrzunehmen.

Da wir jedoch nicht in der Lage waren, uns ein gut wirksames Papayotinpräparat zu beschaffen und das benützte nur geringe proteolytische Kraft besaß, wollen wir hier auf die ausführlichere Mitteilung unserer Befunde verzichten.

C. Säurespaltung der Eiweißkörper.

I. Einwirkung von verdünnter Salzsäure bei Bruttemperatur auf Rinderserum.

Es wurde schon gelegentlich der Pepsinwirkung darauf hingewiesen, daß die Einwirkung von Verdauungssalzsäure auf Eiweiß bei Bruttemperatur keinen erheblichen Einfluß auf das Brechungsvermögen der Lösung ausübt.

Im folgenden sei eine Versuchsreihe angeführt, welche die Unabhängigkeit des Brechungsexponenten der Eiweißkörper von der Salzsäurewirkung dartut, wiewohl das Eiweiß durch die Salzsäure rasch unter Bildung von Albumosen und Peptonen zerfiel, wie das ja schon aus den Angaben von Fr. Goldschmidt[38]) hervorgeht.

Der Versuch wurde derart angestellt, daß dialysiertes Rinderserum, mit dem gleichen Volumen von $^1/_4$ n-Salzsäure versetzt, in ein auf 40° temperiertes Wasserbad eingestellt wurde und der Spaltungsflüssigkeit von Zeit zu Zeit Proben zur Prüfung entnommen wurden.

Die Bestimmungen fanden bei 25° statt.

	Entnahme der Probe	Dauer der Säurewirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex
1.	16./I. 05 5h 35' nachmittags	unmittelbar nach Säurezusatz	65° 59'	1,339131
2.	16./I. 05 6h 21' abends	46 Minuten	65° 59'	„
3.	16./I. 05 7h 31' abends	1 Stunde 4 Minuten	65° 59' 30"	1,33909
4.	16./I. 05 8h 31' abends	2 Stunden 4 Minuten	65° 59' 30"	„
5.	17./I. 05 10h 30' vormittags	Die Lösung über Nacht in der Kälte gehalten	66° 00'	1,33905
6.	17./I. 05 11h 30' vormittags	3 Stunden 4 Minuten	66° 00'	„
7.	17./I. 05 12h 30' nachmittags	4 „ 4 „	66° 00'	„
8.	17./I. 05 1h 30' nachmittags	5 „ 4 „	66° 00'	„
9.	17./I. 05 4h nachmittags	7 „ 33 „	66° 00'	„
10.	17./I. 05 6h abends	9 „ 33 „	65° 59' 30"	1,33909
11.	17./I. 05 8h abends	13 „ 33 „	65° 59' 30"	„

Ähnliche Versuche wurden angestellt, um den Einfluß der Acidalbuminbildung auf die Refraktion zu prüfen; aus mehreren derartigen Versuchen, die sowohl mit unverdünntem als auch mit verschieden verdünntem, dialysiertem Rinderserum unternommen wurden, sei hier nur noch der folgende angeführt.

Von drei Lösungen, von denen jede 2 ccm Rinderserum und 2 ccm ¼ Normalsalzsäure enthält, bleibt die eine (a) 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, die zweite (b) wird eine Minute im kochenden Wasserbade und hierauf 6 Stunden bei Zimmertemperatur belassen und endlich die dritte (c) wird kurz über freier Flamme aufgekocht.

Diese drei Lösungen zeigen dann folgendes refraktometrische Verhalten. Ablesungstemperatur 25°.

	Brechungswinkel	Brechungsindex
Lösung a)	66°	1,33905
Lösung b)	66°	1,33905
Lösung c)	66° 1'	1,33897

Alle drei Lösungen zeigen also trotz der bei verschiedener Behandlung eingetretenen Acidalbuminbildung den identischen Brechungsexponenten.

II. Einwirkung verdünnter Salzsäure auf Rinderserum bei Siedetemperatur.

Hat die Einwirkung verdünnter Salzsäure bei Bruttemperatur oder kurz dauernder Einwirkung bei höherer Temperatur auch keinen Einfluß auf das Brechungsvermögen, so ändert sich dieses Verhalten auffällig, wenn man siedende Säure längere Zeit auf Eiweiß einwirken läßt, wie folgende Versuche zeigen.

a) Wirkung von 1/4 Normal-HCl. b) Wirkung von 2,5 proz. HCl.

20 ccm dialysierten Rinderserums werden mit 20 ccm 1/4 Normal-HCl. versetzt und sofort nach der Mischung die erste Probe entnommen und der Rest über freier Flamme unter dem Rückflußkühler gekocht; die von Zeit zu Zeit der Flüssigkeit entnommenen Proben werden bei 24,8° bestimmt; in genau gleicher Weise wurde der Versuch mit der 2,5 proz. HCl ausgeführt, der sich der Übersichtlichkeit wegen in der folgenden Tabelle ebenfalls verzeichnet findet.

a) 1/4 Normal-HCl.			b) 2,5proz. HCl.			
Dauer der Säurewirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Dauer der Säurewirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
Entnahme sofort nach Säurezusatz	66° 01′	1,33897	Entnahme sofort nach Säurezusatz	65° 35′	1,34108	Sehr spärliche Acidalbuminbildung, Flüssigkeit nur opaleszent beim Neutralisieren.
20 Minuten	66° 00′	1,33905	15 Minuten	65° 35′	„	
40 „	66° 00′	„	25 „	65° 33′	1,341244	Starke Acidalbuminbildung, massige Fällung beim Neutralisieren
1 Stunde	65° 58′ 30″	1,33917	35 „	65° 32′ 30″	1,341285	
1 Std. 20 Min.	65° 59′	1,33913	55 „	65° 31′	1,341408	
1 „ 40 „	65° 58′ 30″	1,33917	Nach weiterem Kochen wird die Flüssigkeit dunkel und nicht mehr scharf einstellbar			
2 Stunden	65° 56′	1,339374				
6 1/2 „	65° 56′	1,339374				

Es hat also in beiden Fällen der Brechungsexponent zugenommen und zwar bei der 1/4 Normal-HCl, welche einer 0,9proz. Säure entspricht, innerhalb 2 Stunden um nahezu ebensoviel, wie bei der 2,5proz. HCl in 55 Minuten; in beiden Fällen beträgt die Steigerung rund 40 Einheiten der letzten Dezimalen.

Ein für den Verlauf der Spaltung günstigeres Beobachtungsmaterial als Rinderserum bot das Wittepepton, da hier die Ausscheidung von Melaninen so spät erfolgt, daß sie die refraktometrische Bestimmung nicht hindert.

III. Einwirkung verdünnter Salzsäure auf Wittepepton.

50 ccm 10proz. Wittepeptonlösung werden mit 50 ccm $^1/_4$ Normal-HCl versetzt, sofort nach der Mischung mit dem Refraktometer untersucht und hierauf über freier Flamme unter dem Rückflußkühler gekocht.

Die dem Spaltungsgemisch entnommenen Proben werden bei 24,5° bestimmt und ergeben:

Entnahme der Probe und Dauer der Säurewirkung	Brechungswinkel	Brechungsindex	Zunahme des Brechungsindex
Unmittelbar nach Säurezusatz entnommen	65° 22′ 30″ — 65° 23′	1,342071	
$1^1/_2$ Stunden	65° 22′	1,342154	8,3
$3^1/_2$ "	65° 20′	1,34232	24,9
6 "	65° 21′	1,342237	16,6
$8^1/_2$ "	65° 18′	1,342484	41,3
11 "	65° 18′	1,342484	41,3
16 "	65° 17′	1,342566	49,5
18 "	65° 15′ 30″	1,342689	61,8
30 "	65° 11′	1,343058	98,7

Es findet unter dem Einflusse der Säure eine stetige Zunahme des Brechungsexponenten statt und zwar um relativ ganz bedeutende Werte. Trägt man die Einwirkungsdauer auf die Abszissenachse auf, während auf der Ordinatenachse die Zunahme des Index verzeichnet wird, und vergleicht die erhaltene Kurve mit der für Trypsinwirkung erhaltenen, so bemerkt man ein etwas verschiedenes Verhalten, indem sie kein so regelmäßiges Ansteigen, sondern ein mehr sprunghaftes Anwachsen der Werte anzeigt. Das Fehlen des Ruhepunktes, der gerade für die tryptische Wirkung charakteristisch war, scheint für die Säurespaltung bezeichnend, soweit dies aus längerer Zersetzungsdauer entnommen werden kann; denn Versuchsreihen mit kürzerer Säurewirkung, wie z. B. der folgende Versuch lehrt, zeigten vielfach den auch bei der Trypsinverdauung beobachteten hyperbelartigen Verlauf der Kurve.

Um einen Vergleich mit den bei der Trypsinverdauung erhaltenen Werten des Eiweißabbaues zu haben, wurde ein weiterer

Spaltungsversuch angestellt, die Spaltung jedoch so weit geführt, bis die Zunahme des Brechungsindex etwa der durch die Trypsinverdauung bewirkten gleich kam; hierauf wurde die Spaltung unterbrochen und die Flüssigkeit der fraktionierten Fällung wie früher unterzogen. Zum Vergleiche wurde außerdem eine nicht aufgespaltene Lösung von Wittepepton gleicher Konzentration analysiert.

Die Brechungsexponenten dieser mit dem gleichen Volumen 1/4 Normal-HCl durch 24 Stunden unter dem Rückflußkühler erhitzten 10proz. Wittepeptonlösung ergaben sich während der Spaltung, wie folgt. Ablesungstemperatur 24,8°.

Entnahme der Probe und Dauer der Säurewirkung		Brechungswinkel	Brechungsindex	Zunahme des Brechungsindex
28./II.	Unmittelbar nach Säurezusatz	65° 25′	1,341905	
1./III.	1 Stunde	65° 23′	1,342071	16,6
1./III.	8 Stunden	65° 22′	1,342154	24,9
1./III.	11 Stunden	65° 21′	1,342237	33,2
2./III.	24 Stunden	65° 19′ 30″	1,342361	45,6

Die Fraktionierung wurde auch hier wieder derart ausgeführt, daß in einer Portion die Zinksulfatfällung bei saurer Reaktion stattfand, in einer zweiten die Essigsäuretanninfällung, deren Filtrat wieder zur Phosphorwolframsäurefällung verwendet wurde.

Es ergaben sich für 50 ccm der Lösungen folgende Werte:

Säurespaltung.

	Albumosen-N	Polypeptid-N	Basen- und Pepton-N	Aminosäuren-N	Gesamt-N
N in Grammen	0,1858	0,0269	0,0574	0,1064	0,3766
Proz. des Gesamt-N	49,3 Proz.	7,1 Proz.	15,2 Proz.	28,2 Proz.	99,8 Proz.

5 proz. Wittepeptonlösung.

in Grammen	0,2864	0,0335	0,0176	0,0355	0,3731
Proz. des Gesamt-N	76,7 Proz.	8,9 Proz.	4,7 Proz.	9,5 Proz.	99,8 Proz.

Vergleicht man diese Werte mit denen, welche bei der Trypsinverdauung nach selbst 16stündiger Einwirkung erhalten wurden, also zu einer Zeit, wo die Brechungszunahme etwa jener bei

24 stündiger Säurespaltung gleichkommt, so findet man einen ganz bedeutenden Unterschied, der vor allem in der relativ geringen Abnahme der Albumosenfraktion und einer bedeutenden Zunahme der Basen-Peptonfraktion seinen Ausdruck findet; in beiden Fällen hat dagegen die Aminosäurenfraktion eine Anreicherung erfahren.

Doch können die vorliegenden Daten vorläufig keinen Aufschluß geben, durch welche Momente das Anwachsen des Brechungsvermögens bei der Säurespaltung bedingt ist. Es läßt sich hier, ähnlich wie bei der Trypsinverdauung, nur folgern, daß die Steigerung in weitem Maße von der quantitativen Verteilung der einzelnen stickstoffhaltigen Fraktionen unabhängig ist, wie das insbesondere der Vergleich der Säure- und der Trypsinspaltung dartut.

Anhangsweise möge noch bemerkt werden, daß auch anhaltendes Kochen des Wittepepton über freier Flamme unter Rückfluß bereits eine merkliche Erhöhung des Brechungsvermögens herbeiführt.

Aus den angeführten Versuchen ergibt sich, daß ebenso wie bei der tryptischen Verdauung auch bei der ihr in vieler Beziehung ähnlichen Spaltung durch siedende Mineralsäuren Erhöhung des Brechungsvermögens eintritt, während die bloße Überführung des Eiweißes in Acidalbumin keine wesentliche Änderung des Brechungsindex bedingt.

D. Bakterielle Spaltung eiweißhaltiger Nährböden.

Da sich Pepsin und Trypsin in betreff ihrer Einwirkung auf das Brechungsvermögen so charakteristisch unterscheiden, so war es von Interesse, zu untersuchen, wie sich die durch den Lebensprozeß der Bakterien herbeigeführte Proteolyse nach dieser Richtung verhält. Wir verwendeten zu diesem Zwecke als Nährboden zuckerfreie, leicht alkalisch reagierende Rindfleischbouillon, welcher Wittepepton und Kochsalz zugesetzt war. Als Kulturen wählten wir jene Bakterien aus, welche eine intensive Eiweißproteolyse zu erzeugen vermögen, wie das Proteusbakterium, den Choleravibrio und das Bacterium coli commune, welche beiden letzteren durch Indolbildung in ihren Kulturen beweisen, daß sie Eiweiß weit abbauen können.

Freilich gilt das nur, soweit Coli in Frage kommt, für denaturierte oder bereits aufgespaltene Eiweißkörper (Wittepepton), da ja nach den Untersuchungen von Pfaundler[39]) und nach ihm von Dieudonné[40]) native Eiweißkörper nicht angegriffen werden.

Die beim Coli mögliche Gasbildung [Nitrolyse nach Schloßmann[41])] kam für unsere Versuche kaum in Frage, während die beiden anderen Bakterienarten überhaupt nicht gasbildend sind, so daß ein dadurch etwa bedingter Versuchsfehler vermieden werden konnte.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß je 25 ccm Bouillon mit möglichst gleichen Mengen von Proteus, Coli und Cholera geimpft wurden und mit Gummikappen wohl verschlossen nebst einer sterilen Kontrollprobe derselben Bouillon in den Brutschrank eingestellt wurden.

Nach 8 Tagen haben sich die drei Kulturen in charakteristischer Weise üppig entwickelt, so daß sie zu Bestimmungen verwendet werden konnten. Die durch das Wachstum eingetretene Trübung der Bouillon beeinträchtigte die Bestimmung des Brechungsindex nicht. Ablesungstemperatur 25,6°.

Kultur	Brechungswinkel	Brechungsindex	Anmerkung
Kontrollbouillon	65° 51′ 30″	1,339738	Primäre Albumosen reichlich.
Proteus	65° 56′ 30″	1,339333	Mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung Opaleszenz.
Coli	65° 56′	1,339374	Primäre Albumosen reichlich.
Cholera	65° 53′	1,339617	Primäre Albumosen nur sehr spärlich.

Die qualitative Untersuchung der Eiweißkörper ergab einen Abbau der primären Albumosen bei Proteus und in der Cholerakultur, nicht aber in der Colikultur; sekundäre Albumosen waren in allen Kulturen gleichmäßig vorhanden, ebenso wie auch die Tanninfällung und in deren Filtrate die Phosphorwolframsäurefällung keine Unterschiede ergab. Aminosäuren waren in allen Kulturen reichlich, am schönsten in der Proteuskultur mit der Chinonreaktion nachweisbar, während die Kontrollbouillon keine Chinonreaktion gab.

Der Versuch zeigt, daß bei dem Wachstum der hier verwendeten Bakterienarten eine ganz entgegengesetzte Beeinflussung des Brechungsvermögens eintritt, als wir bisher beobachtet hatten, nämlich eine Verminderung des Brechungsexponenten.

Wir ersehen daraus, daß die durch Bakterien erzielten fermentativen Prozesse in ihrer Gesamtwirkung von der Pepsin-, Trypsin- und Säureproteolyse ganz verschieden sind.

Zur besseren Beleuchtung dieses Unterschiedes wurde die gleiche Bouillon, die als Nährsubstrat Verwendung fand, mit Soda und 0,4 g Trypsin einer zweitägigen Verdauung im Brutschrank ausgesetzt. Es ergab sich (Ablesung bei 25,3°):

Sofort nach Fermentzusatz entnommen	65° 26′	$N_D = 1,341822$
Nach zweitägiger Einwirkung	65° 23′	$N_D = 1,342071$

Während also die Bakterien eine erhebliche Herabsetzung des Brechungsexponenten herbeiführen, wird er in derselben Bouillon durch das Trypsin rasch erhöht.

Welche biologische Bedeutung dieser entgegengesetzten Beeinflussung des optischen Gleichgewichtes beizumessen ist, soll hier nicht weiter erörtert werden. Es sei nur darauf hingewiesen, daß wir anscheinend in diesem Verhalten der Bakterien gegenüber eiweißhaltigen Nährböden ein wichtiges biologisches Kennzeichen besitzen.

Inwieweit die oben bestehenden Schwankungen in der Abnahme des Brechungsexponenten für die einzelnen Bakterienarten spezifisch sind, oder ob sie von dem mehr oder minder reichlicheren Wachstum abhängen, kann vorläufig nicht ausgesagt werden und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

Bei Übersicht aller durchgeführten Versuche tritt deutlich die Tatsache hervor, daß wir mit Hilfe des Brechungsvermögens die verschiedenen Fermente in charakteristischer Weise zu kennzeichnen vermögen.

Wir können die Fermentwirkungen je nach ihrer Beeinflussung des Brechungsvermögens einteilen 1. in solche, welche es unbeeinflußt lassen, 2. in solche, welche es erhöhen, und 3. in solche, welche es vermindern.

In die erste Gruppe gehören unter den von uns untersuchten Fermenten Emulsin (bei der Wirkung auf Amygdalin und Salicin), Diastase (bei der Einwirkung auf Dextrin) und Pepsin (bei der Einwirkung auf Eiweißkörper). In die zweite Gruppe sind zu zählen die Wirkungen des Trypsins auf Eiweiß und dessen Derivate. Eine gleichsinnige Einwirkung findet auch bei der Säurespaltung von Eiweißkörpern statt. Die dritte Gruppe endlich umfaßt die von uns untersuchten bakteriellen Spaltungen von Eiweißkörpern.

Es ergibt sich ferner für die Wirkung des Pepsins auf Eiweißkörper das Gesetz, daß der Brechungsexponent des ungespaltenen Eiweißkörpers gleich ist dem Brechungsexponenten der

Summe der Spaltungsprodukte, für die Wirkung des tryptischen Fermentes dagegen, daß der Brechungsexponent des intakten Eiweißes kleiner ist, als der Brechungsexponent der Summe der Spaltungsprodukte.

Literaturverzeichnis.

1) E. Schütz, Eine Methode zur Bestimmung der relativen Pepsinmenge. Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 577.

2) E. Schütz und H. Huppert, Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. Pflügers Archiv **80**, 470.

3) G. Tammann, Die Reaktionen der ungeformten Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 271.

4) F. Klug, Untersuchungen aus dem Gebiete der Magenverdauung. Ungar. Archiv f. Medizin **3**, 87 (zitiert nach Maly **24**, 334).

5) D. Lawrow, Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 447.

5a) M. Siegfried, Über Antipepton (II. Mitteilung). Das. **35**, 164.

5b) Gamgee und Jones, Über die Nucleoproteide des Pankreas. Diese Beiträge **4**, 10.

5c) Gamgee und Croft Hill, Über die optische Aktivität des Hämoglobins und des Globins. Das. **4**, 1.

5d) Mett, Contribution à l'inervation de la glande sous-stomacale. Petersburg 1889.

6) Borissow, Inaugur.-Dissertat. Petersburg 1891.

7) Jul. Schütz, Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 1.

8) G. Linossier, Nachweis und Bestimmung des Pepsins im Mageninhalt von Dyspeptischen. Journ. de Physiologie **1**, 281 (1899).

9) H. Friedenthal, Über eine neue Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit von Fermentlösungen. Centralblatt f. Physiologie **13**, 481.

H. Friedenthal, Über chemische Bindungen zwischen kolloiden und kristalloiden Substanzen. Das. **13**, 54.

10) M. Oker-Blom, Die elektrische Leitfähigkeit und die Gefrierpunktserniedrigung als Indikatoren der Eiweißspaltung. Skand. Archiv f. Physiologie **13**, 359.

11) Sjöquist, Physiologisch-chemische Beobachtungen über Salzsäure. Skandin. Archiv f. Physiologie **5**, 334 (1895).

11a) V. Henri und Larguier des Bancels, Gesetz der Wirkung von Trypsin auf Gelatine. Compt. rend. soc. biolog. **55**, 563, 787, 866 (1903).

11b) O. Nasse, Wirkung der Fermente. Vortrag 15. Dezember 1894 (Rostocker Zeitung), zitiert nach Oker-Blom.

12) E. J. Spriggs, Eine neue Methode der Bestimmung der Pepsinwirkung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **35**, 465.

13) E. Fuld, Über die Milchgerinnung durch Lab. Diese Beiträge **2**, 169.

14) R. O. Herzog, Fermentreaktion und Wärmetönung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 383.

15) Tangl und Farkas, Beiträge zur Energetik und Ontogenese. Pflügers Archiv **93**, **98** und **104**.

15a) M. Rubner, Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen. Archiv f. Hygiene **48**, 260.

[15b]) Brühl, Vergleiche dessen zahlreiche Arbeiten in der Zeitschr. f. physikal. Chemie, im Journ. f. prakt. Chemie und den Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft; ferner: E. Rimbach in Graham-Otto, Lehrbuch der Chemie (III. Abteilung). Über die Beziehungen zwischen Lichtbrechung und chemischer Zusammensetzung der Körper.

[16]) H. O. G. Ellinger, Journ. f. praktische Chemie (Neue Folge) **44**, 256 (1891).

[17]) A. Strubell, Verhandlungen des XVIII. Kongresses f. innere Medizin zu Wiesbaden 1900.

A. Strubell, Über refraktometrische Blutuntersuchungen. Münchener med. Wochenschrift 1902, S. 616.

A. Strubell, Über eine neue Methode der Urin- und Blutuntersuchung. Deutsch. Archiv f. klin. Medizin **69**, 521.

[18]) J. A. Grober, Quantitative Zuckerbestimmungen mit dem Eintauchrefraktometer. Centralblatt f. innere Medizin **21**, 201.

[19]) E. Reiß, Der Brechungskoeffizient des Blutserums als Indikator für den Eiweißgehalt. Dissertat. Straßburg 1902.

E. Reiß, Der Brechungskoeffizient der Eiweißkörper des Blutserums. Diese Beiträge **4**, 150.

E. Reiß, Eine neue Methode der quantitativen Eiweißbestimmung. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **51**, 18.

[20]) H. Strauß, Über den Brechungsindex von Mageninhalten. Deutsche Arzte-Zeitung 1901, Nr. 4.

[21]) H. Strauß und Chajes, Refraktometrische Eiweißbestimmungen am menschlichen Blutserum und ihre klinische Bedeutung. Zeitschr. f. klin. Medizin **52**, 536.

[22]) M. Krause, Vergleichende Untersuchungen über Pfeilgiftglykoside und andere Glykoside der Digitalisgruppe mit Hilfe des Brechungsexponenten und der Dispersion. Zeitschr. f. exper. Pathologie und Therapie **1**, 680.

[23]) F. Pregl, Über die Ursache der Schwefelsäurefluoreszenzreaktion der Gallensäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **45**, 166.

[24]) Croft Hill, Reversible Zymohydrolysis. Journ. of Chem. Soc. **73**, 634 (1898) und Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 1380.

[25]) O. Emmerling, Synthetische Wirkung der Hefemaltase. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **34**, 600, 2206 und 3810.

[26]) J. H. Kastle und A. S. Löwenhart, Über Lipase, das fettspaltende Enzym und die Umkehrbarkeit seiner Wirkung. Amer. chem. Journ. **24**, 491 (1901).

[27]) Hanriot, Sur la reversibilité des actions diastasiques. Compt. rend. soc. biolog. **53**, 70.

[28]) E. Fischer und F. Armstrong, Synthesen einiger neuer Disaccharide. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **35**, 3144 (1902).

[29]) Herzog, loc. cit.

[30]) E. F. Armstrong und R. J. Caldwell, Studien über Enzymwirkung; IV. Sukroklastische Wirkung der Säuren im Vergleich mit der der Enzyme. Chem. Centralblatt **2**, 514, 1609 (1904).

[31]) E. Zunz, Weitere Untersuchungen über den Verlauf der peptischen Eiweißspaltung. Diese Beiträge **6**, 435.

E. Zunz, Contribut. à l'étude de la digestion peptique et gastrique. Annal. d. l. Societé Royale d. scienc. med. et natur. de Bruxelles. T. XI, fasc. I (1902).

32) L. Pollak, Zur Frage der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins. Diese Beiträge **6**, 95 (1904).

33) C. Oppenheimer und H. Aron, Über das Verhalten des genuinen Serums gegen die tryptische Verdauung. Das. **4**, 279 (1904).

34) M. Schwarzschild, Über die Wirkungsweise des Trypsins. Das. **4**, 155.

34a) Th. Curtius, Über die freiwillige Zersetzung des Glykokollesters. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **37**, 1284.

34b) E. Fischer und P. Bergell, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **36**, 2598.

35) E. Fischer und Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreasferment. Sitzungsberichte der königl. preußisch. Akademie. Berlin **1905**, S. 290.

35a) E. Fischer und Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasferment. Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 81 und **40**, 214.

36) M. Nencki, Über die Spaltung der Säureester der Fettreihe und der aromatischen Verbindungen im Organismus und durch das Pankreas. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **20**, 367.

37) Wl. Gulewitsch, Über das Verhalten des Trypsins gegen einfachere chemische Verbindungen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 540.

38) Fr. Goldschmidt, Über die Einwirkung von Säuren auf Eiweißstoffe. Inaugur.-Dissertat. Straßburg 1898.

39) M. Pfaundler, Über das Verhalten des Bact. coli zu gewissen Stickstoffsubstanzen und zur Stärke; Centralblatt f. Bakteriologie und Paras. **31**, 114 (1902); siehe ferner: Escherich und Pfaundler, Bacterium coli commune: Kolle und Wassermanns Handbuch der pathog. Mikroorgan. 1902.

40) A. Dieudonné, Über das Verhalten des Bact. coli zu nativem und denaturiertem Eiweiß. Hygien. Rundschau 1902, Nr. 18.

A. Dieudonné, Veränderungen der Eiweißkörper des Blutserums bei hohen Fiebertemperaturen. Sitzungsbericht der Gesellschaft f. Morphologie und Physiologie. München **21**, 18 (1905).

41) A. Schloßmann, Zitiert nach Escherich und Pfaundler in Kolles und Wassermanns Handbuch 1902, S. 367.

XIX.

Über Organeiweiß.

Von **Julius Pohl.**

Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität Prag.

Erste Mitteilung.

Die Leichtigkeit, mit der die Eiweißkörper des Blutes, der Eier, der Milch, der Pflanzensamen in natürlichem, unverändertem Zustande zugänglich sind, ist der äußere Grund dafür gewesen, daß sich die Eiweißchemie vorwiegend mit ihnen als Ausgangsmaterial beschäftigt hat, daß ferner die Veränderungen, die durch Erkrankung, Immunisierung, Vergiftung in Organismen gesetzt werden, fast ausschließlich an dem am besten zugänglichen Blute verfolgt wurden. In letzterer Richtung befinden wir uns derzeit geradezu wieder in einer humoral-pathologischen Periode, die besonders durch zwei Immunisierungsphänomene — Nachweisbarkeit von Antitoxin und Präzipitin im Serum — reichste Förderung erfahren hat.

Es wäre von vornherein nicht unwahrscheinlich, daß ähnliche Vorgänge wie im Blute auch in den Organen stattfinden, ja daß letztere Voraussetzung für die ersteren sind. Jedenfalls schien es mir nicht unberechtigt, bei einer im größten Umfang und konstant auftretenden Antireaktion die Beteiligung der Organe festzustellen. Es hat Moll*) in meinem Laboratorium nachgewiesen, daß jeder systematisch wiederholten Eiweißinjektion im Plasma bzw. Serum der Versuchstiere 1. eine Fibrinogen- und Globulinvermehrung, sowie 2. das Auftreten von Präzipitin folgt, das mit einer Spur des zur Injektion benützten Eiweißkörpers zusammengebracht zur Präzipitatbildung und -abscheidung führt.

Es erhebt sich die Frage, gehen diesen mit, dem gewöhnlichen Sprachgebrauch nach, ungiftigem Material ausgelösten Veränderungen homologe Reaktionen in den Organen parallel oder voraus, oder verlaufen jene genuin im Blute?

---

*) Diese Beiträge **4**, 578.

Da die Globulinvermehrung auf Kosten des Blutalbumins erfolgt, so war dabei eine Mitbeteiligung der Organe nicht wahrscheinlich: allein immerhin konnte sich der Gesamtbestand der Organeiweißkörper während dieses Prozesses qualitativ ändern. Die betreffenden Versuche, die Doz. Dr. Friedl Pick auszuführen die Freundlichkeit hatte, führten in der Hauptsache zu einem negativen Resultat, weshalb auf ihre spezielle Veröffentlichung verzichtet wurde. Sie ergaben, daß es nicht gelang, in den Organen eine homologe Zunahme der Globulinwerte nachzuweisen, daß ferner in den — blutfrei gewonnenen — Organextrakten keine Präzipitine vorhanden waren. In dieser Richtung sei ein Versuch Dr. F. Picks wiedergegeben.

Versuch vom 4. II. 1904.

2 Kaninchen hatten durch 5 Wochen Rinderserum subkutan erhalten; während normales Kaninchenblut + Rinderserum keine Reaktion erkennen läßt, reagierten die gemengten Immunkaninchensera schon bei Zimmertemperatur auf wenige Tropfen Rinderserum mit Präzipitatabscheidung; die einzelnen Organe der verbluteten Tiere werden mit Kochsalzlösung ausgespült, fein zerhackt, 24 Stunden unter Toluolzusatz in der Kälte mit wenig physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und filtriert: die Plasmen von Muskel, Leber, Niere, Lunge, Milz, Lymphdrüsen, Thymus, Nebennieren geben nach Zusatz von Rinderserum nach 3stündigem Verreiben bei 30° kein Präzipitat; nur im Knochenmarkextrakt treten Flocken auf.

Da gerade das Knochenmarkextrakt rot gefärbt, somit nicht blutfrei war, so habe ich auf den positiven Befund darin keinen Wert gelegt, obwohl für die Bakterienpräzipitine die Herkunft aus den hämatopoetischen Organen, Knochenmark (und Lymphdrüsen) behauptet worden ist. Seitdem hat P. Th. Müller*), von ähnlichen Erwägungen ausgehend, Knochenmarkplasma systematisch auf Veränderung nach Einspritzung avirulenter Bakterieneiweiße untersucht und in ihm eine Vermehrung der Gesamteiweißkörper und des Fibrinogens nachgewiesen. (Letzteres wurde speziell durch Ausfallen auf Fibrinfermentzusatz gekennzeichnet.)

Die weitere Verfolgung obigen allgemein pathologischen Problems wurde vorerst aufgegeben, da es sich zeigte, daß der Organeiweißlösung bisher unbekannte Eigenschaften zukommen, deren genauere Feststellung jedoch von den verschiedensten Gesichtspunkten aus wichtig erschien.

Die Fortschritte der Eiweißchemie des letzten Dezenniums lehren, wie wichtig, ja unentbehrlich quantitativ durchgeführte Abbau- und Spaltungsversuche der Eiweißkörper sind. Alle diese denkwürdigen Erfolge rein analytischer Richtung widerlegen je-

*) Diese Beiträge 6, 454 (1905).

doch die These nicht, daß es insbesonders vom biologischen Gesichtspunkt nicht minder wichtig ist, die Eigenschaften der nativen, unveränderten Eiweißkörper aufs genaueste kennen zu lernen. Unsere bisherigen Kenntnisse der Organeiweißkörper, der Protoplasmabestandteile, müssen, wenn wir die Muskeleiweißkörper ausnehmen, im Vergleich zu den eingangs bezeichneten Eiweißkörpern unvollständig genannt werden.

Zwischen die übliche Redewendung kurzweg von Zellglobulinen zu sprechen und die Forderung Mieschers*), den Inhalt einer Zelle wie ein Mineral, ohne Rest, in seine Einzelbestandteile zu zerlegen, mögen sich die folgenden Befunde als Übergang einfügen.

II.

Lassen wir die Muskeleiweißkörper, die nicht koagulierbaren Nucleoalbumine, die als Kernbestandteile angesehenen Nucleoproteide bei Seite, so ist im wesentlichen folgendes über die Organ- oder Zelleiweißkörper festgestellt worden, wobei ich vielleicht speziell jene Momente, die meiner Erfahrung nach einer Korrektur bedürfen, hervorheben darf.

P. Plósz**), der unter Kühne arbeitete, fand, daß nach Ausspülung der Leber in 0,75proz. NaCl-lösung überging: 1. ein bei 45° koagulabler, in Essigsäure und Salzsäure löslicher, ganz verdaulicher Körper, der völlige Übereinstimmung mit einem Muskeleiweißkörper zeigte; 2. ein bei 70° koagulables Nucleoalbumin; 3. ein bei 75° koagulabler Körper, der vielleicht identisch wäre mit Myosin.

Halliburton***) extrahierte Leber und Nieren mit 5proz. Magnesiumsulfat und fand in der Niere 1. ein im Mittel bei 52° koagulierbares, im Überschuß von Essigsäure lösliches, Phosphor in Spuren enthaltendes Globulin α; 2. ein bei 63° koagulierbares Nucleoalbumin, identisch mit Wooldridges Gewebsfibrinogen, das Nuclein abspaltet; in der Leber ein im Überschuß von Essigsäure leicht lösliches Hepatoglobulin (Koagulationspunkt 45 bis 50°), ein bei 68 bis 70° ausfällbares Hepatoglobulin β, kleine Mengen Nucleoalbumin (bei 56 bis 60° koagulierend) und etwas Albumin. Ingolf Loennberg†) extrahierte Nierenrindensubstanz zuerst mit 0,05 bis 0,1proz. Natronlauge und gewann so einen mit Essig-

*) Arch. f. experim. Pathol. u Pharm. **37**, 104.

) Pflügers Archiv **7, 371 (1893).

***) The proteids of the kidney and liver. Journ. of physiology **13**, 808.

†) Loennberg, Beitrag zur Kenntnis der Eiweißkörper der Niere und Harnblase. Skand. Archiv f. Physiologie **3**, 1892.

säure fällbaren Körper, der bei Pepsinverdauung Nuclein lieferte, neutralisiert nicht koagulierte, im Überschuß von Essig- und Mineralsäuren löslich war; im Nierenmark fand er ein mucinähnliches Nucleoalbumin mit N = 15,6, H = 7, C = 53, P = 0,72, S = 1,14 Proz. Bottazzi*) gewann 1895 aus der Milz 1. ein Cytoglobulin α, koagulierbar bei 49°, 2. ein Protein (Myoglobulin?), koagulierbar bei 63 bis 96°, 3. ein Cytoglobulin β, bei 74 bis 75° koagulierbar, 4. Cytoalbumine, koagulierbar bei 72 bis 73°.

Die von den genannten Autoren ermittelten Tatsachen bedürfen nun im Einzelnen einer Richtigstellung, speziell in einigen funktionell bedeutsamen Details.

III.

Die Gewinnung einer Organeiweißlösung, von mir im folgenden wegen der Beziehung zu Protoplasma als Organplasma bezeichnet, hat vollständiges Freisein von Blutbestandteilen zur wesentlichen Voraussetzung. Die meisten Plasmalösungen habe ich aus Lebern gewonnen, doch finden sich die gleichen eigenartigen Eiweißkörper noch in anderen Organen, von denen derzeit nur erwähnt seien Niere, Milz, Lunge, Ovarium, und sicher auch im Zentral- und peripheren Nervensystem. Letzteres sei ausdrücklich als im Gegensatz zu literarischen Angaben (Halliburton) und wegen der möglichen Wichtigkeit für spätere experimentell-chemische Arbeiten hervorgehoben. Auch in der embryonalen Leber fand ich dasselbe Eiweiß; die Spezies Mensch, Hund, Kaninchen, Katze, Rind, Schwein, Hammel zeigten qualitativ fast übereinstimmende Plasmen; nicht minder der Frosch.

Die Ausspülung der Leber habe ich immer in der Weise vorgenommen, daß in die Vena cava ascendens eine Kanüle eingeführt und von da rückläufig so lange 0,8proz. NaCl-Lösung durchgespült wurde, bis sie aus den abdominellen Gefäßen farblos ablief; dabei empfiehlt es sich, temporär die Gefäße am Leberhilus, die Venae gastroduodenales und die Cava ascendens mit Péans zu verschließen, Flüssigkeit abwechselnd einlaufen, stauen und dann wieder abfließen zu lassen. Das völlig entblutete Organ wird nun feinst zu Brei zerkleinert, mit dem doppelten Volumen obiger Salzlösung nach Toluol- oder Benzolzusatz tüchtig durchgeschüttelt, 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Jetzt wird durch Filtration das Plasma gewonnen: die ersten Anteile sind gewöhnlich trüb, nach wiederholtem Zurückgießen erhält man alsbald völlig klare oder durchscheinende Lösungen. Selbst aus glykogenhaltigen Lebern wird schließlich ein hellgelbes, der Farbe nach an reinstes Blutserum erinnerndes Plasma, meist von neutraler Reaktion, gewonnen.

---

*) Bottazzi, „Les substances albuminoides de la rate." Arch. ital. Biolog. 1895, S. 453.

Das Organplasma gibt alle Farben- und Fällungs-Reaktionen echter Eiweißkörper. Mit Neutralsalzen kann man, wie schon Halliburton angibt, wasserlösliche Fällungen erzwingen. So gibt konzentrierte Kochsalzlösung innerhalb 24 Stunden flockige Fällung: das Filtrat gibt auf Eintragen von Kochsalz (durch Umkristallisieren kalkfrei erhalten) neuerlich einen flockigen Niederschlag; das Filtrat hiervon, verdünnt, gibt wieder mit Ammonsulfat Fällung und selbst das weitere Filtrat läßt auf Säurezusatz noch spärliche Flocken ausfallen. Bei Verwendung konzentrierter Ammonsulfatlösung ist eine durch deutliche Spatien begründete fraktionierte Scheidung in verschiedene Eiweißindividuen nicht möglich. Versetzt man Kaninchenleberplasma (2 bis 3 ccm) nach bekanntem Schema unter abnehmendem Wasserzusatz mit zunehmenden Salzmengen, so findet man, auf 10 ccm gerechnet, bei 1,5 ccm Ammonsulfatlösung beginnende Trübungen, bei 2 ccm schon Flockung, die so rasch zunimmt, daß das Filtrat von 6 ccm bei Hitzekoagulation meist nur noch Spuren von Eiweiß erkennen läßt. Diese Fällungsgrenzen sind insofern in weiten Grenzen konstant, als man die Plasmen ohne Änderung dieses Verhaltens nativ oder 4 bis 5fach verdünnt nehmen kann. Die angeführten Werte sprechen für Globulinnatur der betreffenden Eiweißkörper, ohne daß es vorderhand zweckmäßig erscheint, mehrere Organglobuline zu unterscheiden. Das relative Mengenverhältnis der verschiedenen Fraktionen sei durch ein Beispiel belegt: in einem Kaninchenleberplasma werden die bei 25, 33 und 50 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat ausgefallenen Eiweißkörper quantitativ bestimmt. Bei einem Gesamteiweißgehalt von 2,136 Proz. (= 100) verhielten sich die Fraktionen wie 16,4 : 23,8 : 72,8. Die stärkste Fällung entspricht einem Pseudoglobulin.

Von den charakteristischen Eigenschaften der Zellglobuline seien nun einzelne näher besprochen. Zunächst ihr Verhalten zu Säuren, das ja, wie die literarische Einleitung lehrt, oft schon zur Darstellung derselben herangezogen wurde. Sie fallen mit den schwächsten Konzentrationen von organischen und anorganischen Säuren. Ich benutzte meist eine 0,1 bis 0,2proz. Essigsäure zur Fällung. Frische Plasmen reagieren schon auf schwachen Säurezusatz durch Niederschläge, die selbst mit Überschuß dieser Säure behandelt ungelöst bleiben: die sauren Filtrate, äußerst vorsichtig neutralisiert, geben entweder gar keinen oder nur Spuren, einen Hauch von Neutralisationspräzipitat. Hierdurch unterscheidet sich das Organplasma wesentlich vom Muskelplasma.

Bereitet man sich, wie oben für parenchymatöse Organe angegeben, aus Muskel ein Plasma — also im Prinzip nur Verwendung des von Fürthschen*) Verfahrens ohne Isolierung der einzelnen von letzterem präzis charakterisierten Eiweißkörper — so reagiert dasselbe auf obige Essigsäure mit dichtem Niederschlag, der sich im Überschuß völlig und schnell löst, um auf Neutralisation wieder dicht auszufallen.

Seit der Arbeit von Plósz findet sich in allen auf unser Thema bezüglichen Studien der immer wiederkehrende Gedanke, daß in den Organen den im Muskel vorkommenden ähnliche Eiweißkörper vorhanden seien, Myosine. Ich habe deshalb wiederholte Vergleiche von Muskelplasmen und Organplasmen in bezug auf ihr Fällungsvermögen durch bestimmte Körper durchgeführt, wobei ich natürlich auf die Erfahrungen v. Fürths einzugehen hatte. Die Resultate seien in folgender Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Substanz (zum Plasma zugefügt)	Muskelplasma (3,6 Proz. Rückstand enthaltend)	Kaninchenleberplasma (3 Proz. Trockenrückstand enthaltend)
1. Magnesiumchlorid oder -nitrat, kalt gesättigt	fällt beim Stehen	0 Reaktion
2. Chlorcalcium 10 Proz.	dichte Fällung (auf gleiches Volumen)	Spur von oben einsetzender Trübung
3. Jodkalium 10 Proz.	Fällung (nach $^1/_2$ h)	0 Reaktion
4. 5proz. Rhodankalium	Fällung	0 „
5. Natrium salicylic.	Fällung	0 „
6. Pikrinsaur. Ammonium	Fällung	0 „
7. Antipyrin 10 Proz.	Fällung	0 „
8. Phloridzin, kalt gesättigt	Fällung	Opaleszenz
9. 0,2proz. Essigsäure	Fällung, im Überschuß leichtest löslich	Fällung, im Überschuß nicht löslich

Vergleicht man diese Befunde mit denen v. Fürths (loc. cit.), dann muß man schließen, das Organglobulin hat nichts mit dem Myogen gemein und unterscheidet sich auch in wichtigen Reaktionen z. B. im Verhalten zu Essigsäure vom Myosin.

So ähnlich also in Einzelheiten Muskel- und Organeiweiße sein mögen — so ist der leichte spontane Übergang in unlösliche

*) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. **36**, 231; **37**, 389.

Modifikationen beiden gemeinsam; ebenso die niedrige Koagulationstemperatur und die Reaktion gegen Chlorcalcium, die noch unten erörtert werden wird — von einer Identität beider kann nicht gesprochen werden. Das Verhalten zu Essigsäure, Jodkalium, Magnesiumchlorid, Rhodanid und Salicylat usw. läßt beide als recht verschieden erscheinen. Daß Beziehungen zwischen Muskeleiweiß und Organeiweiß bestehen, läßt ja auch die berühmte Beobachtung Mieschers über das Schwinden der Skelettmuskulatur beim Wachsen der Ovarien des Lachses erschließen. Eine Verwandtschaft beider Eiweißarten besteht sicher: es ist Sache der Zukunft, festzustellen, auf welchen konstitutiven Eigenschaften (man denke zunächst an die Spaltungsprodukte) dieses Verhältnis beruht. Auch Phytoglobuline reagieren leicht mit Essigsäure schwacher Konzentration, doch besitzen sie einen weit höheren Koagulationspunkt als die tierischen Organglobuline.

Die Säurefällung der Organglobuline ist — im Gegensatz zum Serumglobulin — in Neutralsalzen unlöslich; löslich natürlich in schwachen Alkalien und, bis auf Spuren, vollständig mit Pepsinsalzsäure verdaulich.

Kaninchenleberplasma mit obiger Essigsäure gefällt, enthält im Filtrate nur noch Spuren von Eiweiß, hingegen ist in den Organplasmen anderer Tiere neben den Globulinen noch deutlich ein Eiweißkörper von den Fällungsgrenzen der Albumine vorhanden.

Überraschend sind die Koagulationsverhältnisse der Plasmen.

Der Koagulationspunkt einer Eiweißlösung hängt, wie schon oft ausgeführt worden ist, von der Art der Erhitzung ab und so auch in unserem Fall; bestimmt man die Gerinnungstemperatur in der üblichen Weise, indem man eine die Eiweißlösung enthaltende Eprouvette in einem Wasserbad unter Luftdurchblasen rasch erhitzt, so tritt die erste Trübung unserer Plasmen bei 42° C. (Fall von Kaninchenleberplasma in 1,5 proz. Lösung) ein, bei langsamem Erhitzen oder bei stundenlangem Verreiben in einem Luftbad erfolgt die Koagulation bei 38 bis 39° vollständig, ja bei 35° und noch darunter partiell. Diese Tatsache ist speziell für die Organuntersuchung auf eventuelles Präzipitierungsvermögen von größter bzw. störendster Bedeutung! In diesem niedrigen Koagulationspunkt ist ein weiterer Analogiepunkt mit dem Myosin gegeben, das ebenfalls bei Temperaturen von 32 bis 35° ausfällt (v. Fürth).

Diese Beobachtung in Beziehung gebracht mit der Tatsache, daß unsere Organe normal und dauernd höher temperiert sind als 35°, ohne daß ihre Zellglobuline koagulieren, gab Anlaß, nach dem die Koagulation hemmenden physiologischen Agens zu fahnden. Es gibt eine Reihe die Koagulation der Organplasmen bei 37 bis 40° hemmender, aber auch fördernder Faktoren. Physiologisch am wichtigsten ist die Hemmungswirkung des Serums*). Hierfür folgendes Beispiel:

Tabelle II.

Normales Kaninchenleberplasma und natives Kaninchenserum (mit 6,7 Proz. Gesamteiweißgehalt). Luftbad von 39°.

Leberplasma in ccm	NaCl 0,8 % in ccm	Serum	nach 2^h	nach 10^h	nach 24^h
2	2	0	trüb	koaguliert	koaguliert
„	1,8	0,2	klar	klar	partiell koaguliert
„	1,7	0,3	„	„	„
„	1,6	0,4	„	„	„
„	1,4	0,6	„	„	„
„	1,2	0,8	„	„	opaleszent, 0 Niederschlag
„	1	1	„	„	klar
„	0,4	1,6	„	„	klar
„	0	2	„	„	klar

Zur Klärung der nun auftauchenden Frage, welcher Serumbestandteil diese Wirkung entfaltet, habe ich einerseits Plasmen mit geringen der Blutalkaleszenz entsprechenden Alkalimengen und mit Lecithinsuspension, andererseits mit gereinigten Serumeiweißkörpern versetzt. Während erstere wirkungslos waren, sind letztere deutlich hemmend wirksam. Hierfür ein kurzer Beleg.

Zentrifugiertes Kaninchenserum wird in dünner Schicht ausgebreitet rasch bei 40° getrocknet**), dann feinst pulverisiert mit Alkohol, Toluol und Äther erschöpft. In destilliertem Wasser löst sich das erhaltene Pulver völlig und rasch: dieses Serum enthält neben 4,2 Proz. Eiweiß nur die Blutalkalien und Blutsalze.

*) Ganz homolog ist die von Fürth (loc. cit.) beobachtete Hemmungswirkung desselben für Myogen.

**) Derartig getrocknete Eiweiße können nach gelegentlichen Erfahrungen meines Assistenten Dr. Wiechowski mit Alkohol behandelt werden, ohne die Wasserlöslichkeit zu verlieren.

Tabelle III.
Bei 39° gehalten.

Kaninchen-leberplasma in ccm	Serum	0,8 % NaCl	nach 1^h	nach 2^h	nach 3^h	nach 24^h
1	0,2	0,8	opaleszent	opaleszent	opaleszent	opaleszent
"	0,4	0,6	klar	klar	klar	"
"	0,5	0,5	"	"	"	"
"	0,6	0,6	"	"	"	"
"	0,8	0,2	"	"	"	"
"	1	0	"	"	"	Spur opaleszent
Kontroll. 1	0	1	trüb	Beginn der Flockung	Flocken abgesetzt	Flocken abgesetzt

Wird das von den in flüchtigen Agentien löslichen Stoffen befreite Serum nun noch durch tagelange Diffusion gegen destilliertes Wasser von Salzen, der Masse der Alkalien, dem Euglobulin befreit, so hemmt ein derartiges nur Pseudoglobulin und Albumin enthaltendes Serum noch in deutlichster Weise durch 24 Stunden die 39°-Koagulation.

Eiereiweiß wirkt trotz seines beträchtlichen Alkaligehaltes, der als solcher ebenfalls als koagulationsstörend erkannt wurde, viel schwächer als Blutserum.

Ich habe mir die Frage vorgelegt, ob die Eiweißkoagulation bei so niedriger Temperatur nicht etwa Fermentwirkung unter Säurebildung (Milchsäure?) ist: allein da Plasmen, die mit Natriumfluorid oder Natriumoxalat statt mit Kochsalz gewonnen sind, ebenfalls koagulieren, da ferner schwacher Alkalizusatz die Koagulation bei 40° nicht hemmt, und schließlich aus koagulierten Plasmen nach Alkoholfällung mit Kochsalzlösung keine die Koagulation bei 40° fördernden Extrakte gewinnbar sind, so ist diese Anschauung wohl aufzugeben.

Diese hemmende Wirkung der Sera ist nach obigen Versuchen allein auf die Bluteiweißkörper zurückzuführen. Die Möglichkeit der Koagulationshemmung eines Kolloids für ein anderes ist erst jüngst von Spiro*) betont worden. Immunsera besitzen mit Normalseris verglichen ein unvermindertes Hemmungsvermögen.

*) Diese Beiträge **5**, 291.

Die Gerinnung von Organplasmen wird beschleunigt durch Salze, am energischesten durch Kalksalze. Zusatz weniger Tropfen 10proz. Chlorcalciums auf 5 bis 10 ccm Plasma bewirkt innerhalb 5 Minuten Koagulation bei 39°. Hierauf ist auch die beschleunigende Wirkung von Harn zurückzuführen: denn mit Natriumoxalat behandelter Harn ist ohne Einfluß auf die Koagulation. Ebenso wirkt Zusatz von Gummi, das nach v. Fürth (loc. cit. S. 398) die Myosingerinnung aufhebt, hier wegen des Kalkgehalts koagulationsfördernd.

Kalkzusatz zu Blutserum hebt dessen hemmende Wirkung auf.

Inwieweit Salze, bei gleicher molekularer Konzentration, beschleunigend auf die 39°-Koagulation wirken, lehrt folgende Tabelle IV.

Tabelle IV.

Zusatz von $^1/_{2000}$ Grammmolekül zu je 5 ccm Kaninchenleberplasma (mit 0,42proz. Eiweißgehalt).

Salz	nach $^1/_2$ h	nach 1 h	nach 2 h	nach 6 h
0	klar	klar	trüb	alle Proben koaguliert
NaCl	„	Trübung beginnend	Flocken	
KCl	„	„	„	
NaFl	„	fein flockige Trübung	sedimentiert	
KNO_3	„	schwach trüb	trüb	
$CaCl_2$	dicht trüb, flockig	sedimentiert		
$Na_2SO_4 + 10\,H_2O$	klar	deutliche Trübung	Flocken	
$MgSO_4 + 7\,H_2O$	„			
$(NH_4)_2SO_4$	„			
Na acet.	„	schwach trüb	trüb	
K-Na-Tartrat	„	„		
Dextrose	„	klar		

Ich versuchte sodann durch Diffusion die Organeiweiße zu fraktionieren, doch lassen die Plasmen selbst nach wochenlangem Diffundieren — natürlich unter Toluolzusatz — keine Fraktion ausfallen, sie werden viscid, opaleszent, verlieren das Vermögen, bei 40° zu koagulieren, gewinnen es aber nach Salzzusatz sofort

wieder; ebenso wird die Essigsäurefällung erst nach Salzzusatz möglich.

Dem optischen Verhalten nach sind die Organglobuline, nach einigen orientierenden Versuchen mit der von jeglichem anderen Eiweiß oder Kohlehydrat befreiten Essigsäurefällung, äusserst schwach optisch aktiv, nur eine Spur linksdrehend; seitdem wir durch Gamgees*) Untersuchungen belehrt wurden, daß es auch rechtsdrehende Eiweißkörper gibt, wird dies niemandem mehr als paradox auffallen.

Nunmehr seien einige analytische Daten, an Pferdeleberglobulin gewonnen, angeführt. Ich behalte mir vor, die bei einer Reihe von Leberglobulinen anderer Tiere gewonnenen Befunde demnächst damit in Vergleich zu stellen.

Pferdeleberplasma wird mit verdünnter Essigsäure gefällt, mit Kochsalzlösung albuminfrei gewaschen, in schwachem Alkali gelöst, wieder mit Essigsäure gefällt, mit destilliertem Wasser salzfrei, dann mit Alhohol, Toluol, Äther extrakt- und farbstofffrei gewaschen, getrocknet. Das Präparat von weiß-grauer Farbe gibt mit Wasser erhitzt an dasselbe keine Spur eines Eiweißkörpers ab (keine Fällung mit Ferrocyanwasserstoffsäure oder Phosphorwolframsäure im Filtrat).

Die Analyse gibt folgende Werte bei zwei Bestimmungen.

	I.		II.	
C	47,21	Proz.	48,43	Proz.
N	16,35	"	16,71	"
H	6,79	"	6,98	"
S	0,97	"	0,99	"
P			1,3	"

Außerdem Spuren von Eisen.

Die Untersuchung weiterer sechs Leberglobuline auf ihren Phosphorgehalt ergab äußerst schwankende Werte (0,28 bis 1,3 Proz.), so daß vorderhand der Gedanke auf Verunreinigung bzw. Gegenwart von Gemengen im Essigsäurekörper nicht als widerlegt angesehen werden kann. Übrigens habe ich auch in den gereinigten Säurefällungen von Muskelplasmen Phosphor nachweisen können. Würde sich auch bei ferneren Untersuchungen, die ich demnächst beibringen werde, ein konstanter Phosphorgehalt erweisen lassen, dann würde auf eine Beziehung zwischen den Plasmaglobulinen und den Nukleoproteiden näher einzugehen sein. Speziell wird das Hammarstensche**) α-Proteid des Pankreas, das dem Gewebsfibrinogen (Wooldridge), dem Zellglobulin (Halliburton), dem Nucleoalbumin nahe stehen soll, sowie auch das Wolgemuthsche***)

---

*) Arthur Gamgee u. Croft Hill, sodann A. Gamgee u. Walter Jones, Diese Beiträge **4**, 1 u. 10.

) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chemie **18, 32.

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 474.

Leberprotein zu besprechen sein. Die Koagulationsfähigkeit, die fast restlose Verdaulichkeit, die Salzfällungsgrenzen und die Ungiftigkeit bei intravenösen Injektionen allein sprechen schon jetzt für die Globulinnatur des Hauptbestandteils der Organplasmen.

Vor wenigen Wochen erschien eine kurze Notiz von Doyon, Morel und Péju*), wonach der entbluteten Leber durch 1 proz. Kochsalzlösung ein mit Essigsäure fällbarer Eiweißkörper entzogen werden kann, der identisch mit dem Plósz- und Halliburtonschen Eiweißkörper, dabei aber vom Blutfibrinogen nicht unterscheidbar sein soll. Diese Anschauung scheint ganz unrichtig: Fibrinogen muß mit Blutserum zusammengebracht Fibrin ausfallen lassen: die obigen Beobachtungen beweisen im Gegenteil eine Schutzwirkung des Serums gegenüber unserem Eiweißkörper. Ferner sollen Fluoride die Plasmakoagulation, homolog wie die Fibrinbildung, hemmen; auch dies stimmt mit meinen Erfahrungen nicht überein.

Ich habe ebenfalls genetische Beziehungen zwischen Blutfibrin und Leberglobulinen vermutet und auf folgende Weise zu einem Einblick in dieselben zu gelangen versucht. Wäre z. B. der niedrigst fällende Anteil der Leberglobuline eine Quelle für das Fibrinogen, dann müßten ausgiebige Aderlässe eine Verarmung der Leber daran bedingen.

2 Tieren von 2600 bzw. 1800 g Gewicht wird zuerst ein Aderlaß von 60 bzw. 46 ccm, nach 3 Tagen ein zweiter von 53 bzw. 40 ccm gemacht. Am nächsten Tag werden beide Tiere verbluten gelassen, die Leberplasmen wie obenangeführt gleichmäßig gewonnen und die 25 proz., 33 proz., 50 proz. und Gesamtammonsulfatfällung in denselben quantitativ bestimmt: die relativen Zahlen waren bei Kaninchen I. 15 : 23 : 67 : 100,
„ „ II. 19 : 20 : 71 : 100,
beim Normaltier S. 385. 16,4 : 23,8 : 72 : 100.

Der Versuch läßt keinen Schluß im Sinne der Bildung von Fibrin aus Lebereiweiß zu.

Äußere Umstände haben mich gehemmt, die obigen Angaben speziell nach analytischer Richtung hin vollständig auszuarbeiten. Ich hoffe aber hierüber in Zukunft Mitteilung machen zu können, nicht minder über die Frage nach der Identität der verschiedenen Organglobuline mit Hilfe der analytischen und biologischen Methode, über quantitative Änderungen des Eiweißgehalts der Organe bei bestimmten Vergiftungen usw.

*) Comptes r. société de Biologie Nr. 14, 658 (1905).

XX.

Über die Diffusion in Gallerten.

Von **Kurt Meyer,** Straßburg i. E.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

I.

Daß bei dem Stoffaustausch zwischen der Zelle und der sie umspülenden Gewebsflüssigkeit Diffusionsvorgänge, wenn auch vielleicht in mannigfaltiger Weise modifiziert, eine große Rolle spielen müssen, ist ohne weiteres einleuchtend. Wenn man von der Strömung des Bluts und der Lymphe und von den wenig verbreiteten und jedenfalls wenig ausgiebigen Strömungen im Protoplasma selbst absieht, wird der Stoffaustausch und der Ausgleich von Konzentrationsdifferenzen nur durch Diffusionsvorgänge vermittelt. Von der Geschwindigkeit der Diffusionsströme hängt aber großenteils die Intensität der chemischen Vorgänge in der Zelle ab. Denn dem Protoplasma fehlen die in der chemischen Technik zur Beschleunigung der Reaktionen angewandten Mittel wie Hervorrufung von Flüssigkeitsströmungen durch Erzeugung von Temperaturdifferenzen oder durch mechanische Erschütterung nahezu ganz. Da nun die den tierischen Körper wie das Protoplasma überhaupt zusammensetzenden Stoffe größtenteils kolloidale Natur besitzen, so ist die Frage berechtigt, ob hierdurch eine Abweichung vom gewöhnlichen Ablauf der Diffusionsvorgänge bedingt wird.

Diese Frage ist nach der physikalischen Seite hin schon von Graham*) bei Gelegenheit seiner Diffusionsversuche experimentell in Angriff genommen worden. Er überschichtete eine kochsalzreiche mit einer kochsalzarmen Agargallerte und bestimmte dann schichtenweise die hinüberdiffundierte Kochsalzmenge. Aus dem Ergebnisse dieses Versuches zog er den Schluß, daß durch den

*) Graham, Liebigs Annalen **121**, 5, 29 (1862).

gallertigen Zustand keine Verlangsamung des Diffusionsvorganges bewirkt werde.

De Vries*), der Kaliumchromat- und Kupfersulfatlösungen gegen Wasser einerseits und 4 proz. Gelatine- und Kieselsäuregallerte andererseits diffundieren ließ, fand ebenfalls keine Verschiedenheiten des Diffusionsweges in Wasser und in Gallerte.

Zum gleichen Resultate gelangte später Voigtländer**), dem es hauptsächlich darauf ankam, an Gallerten die Diffusionsgesetze unter Ausschluß der durch Strömungen verursachten Fehler zu studieren. Bei dieser Gelegenheit prüfte auch er noch einmal den Einfluß von Gallerten auf den Diffusionsvorgang.

Voigtländer verwendete bei seinen Versuchen Agargallerte. Was die uns hier allein interessierende Frage der Beeinflussung des Diffusionsvorganges durch Gallerten verschiedener Konzentration betrifft, so prüfte er diese in der Weise, daß er in Glaszylinder, die mit Gallerten von 1 bis 4 Proz. Agargehalt gefüllt waren, Säuren oder Salze aus wässerigen Lösungen hineindiffundieren ließ. Er fand hierbei nun, daß in konzentriertere Agargallerte 0,72 proz. Schwefelsäure weniger tief hineindiffundierte, als in minder konzentrierte. Es ergab sich nämlich der „Diffusionsweg" nach einstündiger Diffusion bei einem Gehalte der Gallerte an

1	Proz.	Agar	zu	8,5 mm
2	„	„	„	7,8 „
4	„	„	„	7,0 „

Dagegen konnte V. keine oder eine nur sehr geringe Beeinflussung der Diffusionsmenge feststellen; diese betrug z. B.

für	1 proz.	Agargallerte	1,08 mg SO_3
„	2 proz.	„	1,10 „ „
„	4 proz.	„	1,09 „ „

Aus seinen Versuchen schließt Voigtländer, daß irgend ein wesentlicher Unterschied zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit in 5 proz. und der in 1 proz. Gallerte nicht bestehe und daher auch zwischen der Diffusion in 1 proz. Gallerte und in Wasser nicht zu erwarten sei. Offenbar stützt er diese Schlußfolgerungen auf seine Bestimmungen der Diffusionsmenge, nicht des Diffusionsweges. Allerdings muß er zugeben, daß die von ihm für Agargallerte ge-

---

*) De Vries, Receuil des travaux chimiq. d. Pays-Bas 3, 375 (1884). Die Angabe Voigtländers, De Vries habe eine Verlangsamung der Diffusionsvorgänge in Gallerte gefunden, kann ich mir nur so erklären, daß V. nicht das Original der Arbeit, sondern nur das allerdings etwas unklare Referat im Jahresber. d. Chemie 1884 vor Augen gehabt hat.

**) Voigtländer, Zeitschr. f. physik. Chemie 3, 316 (1889).

fundenen Konstanten etwas niedriger sind als die von anderen Autoren für die Diffusion in Wasser beobachteten und die von Nernst theoretisch berechneten Werte; er will daher die Frage, ob die Diffusion in Wasser und Agar identisch ist, noch nicht endgültig entscheiden. In seinen Schlußsätzen drückt er sich aber nicht so zurückhaltend aus, sondern erklärt die Diffusionsgeschwindigkeit einer Substanz in verschiedenen Konzentrationen der Agargallerte für gleich.

Nachdem Voigtländer von neuem auf die Brauchbarkeit von Gallerten zum Studium der Diffusionsvorgänge hingewiesen hatte, wurden sie von verschiedenen Autoren bei derartigen Untersuchungen in Anwendung gezogen. So studierte Pringsheim*) das Entstehen und die Fortpflanzungsrichtung von Niederschlägen in einem Gallertzylinder, in dem von zwei Seiten her mit einander reagierende Flüssigkeiten sich entgegendiffundierten. Hüfner**) prüfte die Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen in Gallerten. Wenn er auch keine direkten Vergleichsversuche anstellte, so glaubte er doch eine genügende Übereinstimmung zwischen den auf diese Weise gewonnenen Diffusionskonstanten und den in früheren Versuchen für Diffusion in reinem Wasser ermittelten Werten gefunden zu haben. Morse und Pierce***) untersuchten die Übersättigungserscheinungen, die man beim Ausfallen von Silberchromat in Gelatine beobachtet, ebenfalls an Gelatinezylindern. Bei dieser Gelegenheit fanden sie die Diffusionskonstante des Silbernitrats zu 1,54 gegenüber dem nach der Methode von Nernst theoretisch berechneten von 1,19. Eine Erklärung für diese Abweichung vermochten sie nicht zu geben.

Während die bisher genannten Autoren die Diffusionsgeschwindigkeit in Gallerten der in reinem Wasser gleich oder wenigstens nicht geringer fanden, hatte früher Stefan†) aus Grahams Versuchen durch Berechnung gefunden, daß Chlornatrium in Agargallerte langsamer diffundiert als in Wasser.

Ebenso glaubte Chabry††), der Säure gegen Gelatine und Knorpel, die mit Orcein gefärbt waren, diffundieren ließ, eine Verlangsamung in diesen Medien gegenüber Wasser gefunden zu haben, doch scheint er den Einfluß der Temperatur bei seinen Versuchen nicht genügend berücksichtigt zu haben.

---

*) Pringsheim, Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik **28**, 1 (1895). Zeitschr. f. physik. Chemie **17**, 473 (1895).

) Hüfner, Zeitschr. f. physik. Chemie **27, 227 (1898).

***) Morse u. Pierce, Zeitschr. f. physik. Chemie **45**, 589 (1903).

†) Stefan, Wiener Sitzungsberichte **79**, 215 (1879).

††) Chabry, Journal de Physique **7**, 115 (1888).

Selbst wenn es richtig ist, daß Salzlösung in Gallert langsamer diffundiert als in Wasser, so kann doch der hemmende Einfluß dünner Gallerten auf den Diffusionsvorgang nur niedrig veranschlagt werden. Dem entsprechend ist auch zu erwarten, daß die Anwesenheit von Kolloiden den Ablauf chemischer Reaktionen nicht erheblich beeinträchtigen wird. In der Tat fand Reformatsky*), daß die Katalyse von Methylacetat durch Salzsäure in 1,25proz. Agargallerte ebenso schnell verläuft wie in reinem Wasser. Ebenso beobachtete Levi**), daß wie die Leitfähigkeit und die Gefrierpunktserniedrigung, so auch die Inversion von Rohrzucker durch Salzsäure keine Beeinflussung durch die Anwesenheit von Kolloiden — er verwendete eine 1proz. kolloidale Kieselsäurelösung — erfährt.

II. Der Einfluß der Konzentration der Gallerte auf den Diffusionsweg.

Bei den nachstehenden auf Veranlassung von Prof. Hofmeister ausgeführten Versuchen wurde von dem Gesichtspunkte ausgegangen, daß zum Studium des Diffusionsvorganges in kolloidalen Medien möglichst hoch konzentrierte Gallerten mit solchen von niedrigem Trockengehalt verglichen werden müßten, wobei auch die Erwägung maßgebend war, daß wir es in den tierischen Zellen ebenfalls mit ziemlich hoch konzentrierten Lösungen von Kolloiden zu tun haben. Mit Agar lassen sich nun aber nur Gallerten bis zu einer Konzentration von 5 Proz. herstellen. Demgegenüber beträgt der Gehalt des Protoplasmas an kolloiden Substanzen (Eiweiß, Nucleine, Lecithin usw.) meist um 20 Proz., eine Konzentration, an die die bisher ausgeführten Versuche nicht annähernd heranreichen. Es wurde daher für unsere Versuche Gelatine gewählt, mit der sich homogene Gallerten noch in einer Konzentration von ungefähr 25 Proz. bereiten lassen. Zum Vergleich wurden auch Zylinder aus koaguliertem Eierklar benutzt.

Leider läßt sich bei Leimzylindern das von Voigtländer mit so großem Erfolge geübte Verfahren, Säure in mit einem Indikator gefärbte Gallerte hineindiffundieren zu lassen, nicht benutzen, weil dabei Leim in Lösung geht. Verwendbar ist dagegen das Verfahren von de Vries, Kaliumchromat in Leimzylinder hineindiffundieren zu lassen, soweit es sich nur um Bestimmung des Diffusionsweges handelt. Doch war es wünschens-

*) Reformatsky, Zeitschr. f. physik. Chemie 7, 34 (1891).
**) M. G. Levi, Gazetta chimica italiana 30, 64 (1900).

wert, die Versuche vor allem mit Stoffen auszuführen, die im tierischen Haushalt Verwendung finden. Es wurde daher Chlornatrium benutzt, wobei sich aber, um ein genaueres Verfolgen des Diffusionsvorganges zu ermöglichen, die Notwendigkeit ergab, die Gelatinezylinder nach Beendigung des Versuchs in gleichmäßig dicke Scheiben zu zerlegen und in jeder einzelnen Scheibe die Menge der hineindiffundierten Substanz zu bestimmen.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Reagenzgläser von 28 mm Durchmesser wurden mit der durch Erwärmen verflüssigten Gelatinelösung gefüllt und bis zum Erstarren der Gallerte senkrecht aufgestellt. Dann wurden sie mit der Leimfläche nach abwärts senkrecht in die Salzlösung gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Gläser herausgenommen, außen schnell mit destilliertem Wasser abgespült und behufs Herausnahme des Gelatinezylinders vorsichtig zerbrochen. Das Schneiden des herausgelösten Leimzylinders war wegen seiner Nachgiebigkeit und Zusammendrückbarkeit mit einigen Schwierigkeiten verknüpft. Die Zylinder wurden zu diesem Zwecke in eine passende Blechhülse gelegt und nur soweit darin vorgeschoben, daß gerade nur ein 5 mm langes Stück herausragte. Dieses wurde leicht gegen eine Glasplatte gedrückt, mit einem erwärmten dünnen Messer abgetrennt, und so wurde der Leimzylinder in annähernd 5 mm dicke Scheiben zerlegt.

Wie sich aus den in den Tabellen aufgeführten Zahlen für das Gewicht der Scheiben ergibt, ließ sich wegen der großen Elastizität der Leimgallerte nur eine recht mangelhafte Gleichmäßigkeit erreichen. Um nun vergleichbare Zahlen der Kochsalzkonzentration zu erhalten, wurde von jeder Scheibe und zwar möglichst bald, um einen Wasserverlust zu vermeiden, das Gewicht auf Centigramme genau bestimmt und der später gefundene Salzgehalt dann in mg pro ein g Gelatine umgerechnet. Wenn es auch auf diese Weise nicht gelang, den Fehler ganz auszuschalten, der dadurch bedingt ist, daß bei verschiedener Dicke der Scheiben zweier Versuchsreihen die einander entsprechenden Scheiben nicht genau aus gleicher Höhe stammen, sodaß z. B., wenn die erste Scheibe zu dünn geraten ist, alle folgenden einen relativ zu hohen Salzgehalt aufweisen müssen, so dürfen doch die Werte innerhalb derselben Versuchsreihe als vergleichsweise richtig angesehen werden.

Zunächst wurden die in Gallerten verschiedener Konzentration unter den gleichen Bedingungen hineindiffundierenden Kochsalzmengen bestimmt. Es wurde Normalkochsalzlösung verwendet und zwar in solchem Überschusse, daß die durch Hinausdiffundieren von Kochsalz bewirkte Konzentrationsänderung vernachlässigt werden konnte. Die Temperatur war Zimmertemperatur. Sie schwankte um 20° C. Da die Zylinder verschiedener Konzentration in je einer Versuchsreihe unter genau den gleichen Bedingungen standen, so hat die Vernachlässigung der Temperaturkonstanz für das zunächst interessierende Resultat, die Beeinflussung des Diffusionsvorganges durch verschiedene Konzentrationen, keine Bedeutung, wohl aber erschwert sie einen Vergleich der Versuchsreihen unter einander.

Die geprüften Gallerten hatten auf lufttrockene Gelatine berechnet in der ersten Versuchsreihe einen Gelatinegehalt von 10, 15, 20 und 25 Proz., in der zweiten einen solchen von 10, 20 und 25 Proz. Da der Wasser-

gehalt der käuflichen Gelatine, der durchschnittlich 20 Proz. beträgt, immerhin wechselt und da bei der Bereitung der konzentrierten Gelatinelösungen, die sich nur durch wiederholtes Verdünnen und Eindampfen homogen darstellen lassen, ziemlich bedeutende Fehler unterlaufen, so wurde bei den Gallerten der zweiten Versuchsreihe der Trockengehalt genau bestimmt. Er ergab sich:

in der „zehnprozentigen" . . . . . zu 7,929 Proz.
„ „ „zwanzigprozentigen" . . . „ 16,153 „
„ „ „fünfundzwanzigprozentigen" . „ 23,968 „

Der Kochsalzgehalt wurde titrimetrisch nach Volhard bestimmt. Der Übelstand, daß das Chlorsilber zunächst in kolloidalem Zustand ausfiel und beim Filtrieren durch das Filter ging, ließ sich dadurch beheben, daß die Flüssigkeit mit Salpetersäure sehr stark sauer gemacht und für $^1/_2$ bis 1 Stunde im siedenden Wasserbade gehalten wurde, wobei das Chlorsilber vollständig zu Boden fiel. Der Fehler, der durch die Anwendung überschüssiger Salpetersäure verursacht wurde, kommt hier nicht in Betracht, da er unter 1 Proz. liegt, wie durch Kontrollbestimmungen an Gallerten mit bekanntem Kochsalzgehalt festgestellt wurde.

So wurden in einer Gallerte, die 0,5219 g NaCl enthielt, 0,5201 g durch Titration gefunden.

In den folgenden Tabellen enthält die erste Kolumne das Gewicht der Scheiben in g, die zweite den wirklichen Kochsalzgehalt in jeder Scheibe, die dritte den Kochsalzgehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet, die letzten beiden Werte in mg. Die Zahlen sind bis zur Konstanz angeführt. Sie sinken nicht auf Null wegen des Gehalts der käuflichen Gelatine an Chlor. Dieser wurde in zwei Proben zu 0,424 Proz. und 0,430 Proz. Chlor, auf trockene Gelatine berechnet, gefunden. Es sind daher als Grenzwerte anzusehen:

bei 10 proz. Gelatine 0,7 mg Chlornatrium
„ 15 „ „ 1,1 „ „
„ 20 „ „ 1,4 „ „
„ 25 „ „ 1,8 „ „

Die letzten Zahlen, die nach Abzug dieser Werte noch ein Eindringen von Kochsalz erkennen lassen, sind durch Fettdruck hervorgehoben worden.

Reihe I. n-NaCl-Lösung. Versuchsdauer 24 Stunden. Zimmertemperatur. 10 proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	1,99	94,8	47,6
2.	2,10	81,9	39,0
3.	2,51	71,4	35,8
4.	2,71	69,0	25,5
5.	2,45	33,5	13,4
6.	2,08	—	—
7.	1,91	10,0	5,1
8.	1,95	5,9	3,0
9.	—	—	—
10.	—	—	—

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	1,65	81,9	49,6
2.	1,69	81,9	48,5
3.	1,76	56,2	31,9
4.	1,95	46,8	24,0
5.	2,01	34,5	17,2
6.	2,16	24,6	11,4
7.	1,66	11,7	7,1
8.	1,67	7,0	4,2
9.	1,83	3,5	1,9
10.	1,76	1,2	0,7

15proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	1,22	57,3	47,0
2.	1,97	78,4	39,8
3.	2,36	71,4	30,2
4.	2,48	60,8	24,5
5.	2,01	30,4	15,1
6.	2,46	18,7	7,8
7.	2,35	11,7	5,0
8.	2,59	5,9	2,3
9.	2,13	2,3	1,1

20proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	2,39	113,5	47,5
2.	2,14	74,9	35,0
3.	2,51	63,2	25,2
4.	1,99	33,9	17,0
5.	1,95	23,4	12,0
6.	1,89	14,0	7,4
7.	2,35	11,7	5,0
8.	2,19	5,9	2,7
9.	2,46	1,2	0,5

25proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	2,71	121,8	44,9
2.	2,43	73,7	30,3
3.	2,23	46,8	21,0
4.	2,12	32,8	15,5
5.	2,39	17,6	7,3
6.	2,58	9,4	3,6
7.	2,52	4,7	1,9
8.	2,41	2,3	1,0

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	1,77	84,2	47,6
2.	2,46	84,2	34,2
3.	2,19	52,7	24,0
4.	2,23	35,1	19,8
5.	2,65	22,2	8,4
6.	2,42	16,4	6,9
7.	2,49	5,9	2,4
8.	2,49	2,3	0,9

Reihe II. n-NaCl-Lösung. Versuchsdauer 24 Stunden.

Zimmertemperatur. 10proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	2,77	112,3	40,6
2.	2,99	74,4	24,9
3.	3,06	53,8	18,4
4.	2,92	17,6	6,0 *
5.	2,62	15,2	5,8
6.	2,99	7,0	2,3
7.	3,05	3,5	1,2
8.	3,13	2,3	0,8
1.	2,65	93,6	35,3
2.	3,00	61,1	20,4
3.	3,10	37,7	12,2
4.	3,19	23,4	7,3
5.	3,12	11,7	3,8
6.	3,08	4,7	1,5
7.	2,86	2,3	0,8

20proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	2,93	110,0	37,5
2.	3,54	71,3	20,2
3.	3,13	38,6	12,3
4.	3,19	18,7	5,9
5.	3,15	9,4	3,0
6.	3,31	4,8	1,2
7.	3,07	2,3	0,8
1.	2,90	114,7	39,5
2.	3,54	87,8	24,8
3.	3,47	56,2	16,2
4.	3,24	25,7	7,9
5.	3,22	11,7	3,6
6.	3,17	4,7	1,5
7.	3,40	2,3	0,7

25proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	2,99	104,1	34,8
2.	3,93	92,4	23,5
3.	3,92	43,2	11,0
4.	3,52	14,0	4,1
5.	3,79	5,8	1,5
1.	2,87	112,3	39,1
2.	3,05	64,2	21,1
3.	3,30	44,5	13,5
4.	3,86	19,9	5,2
5.	3,28	6,4	2,0
6.	3,34	3,5	1,0

Zur besseren Übersicht sind in den folgenden Figuren die relativen Kochsalzwerte graphisch dargestellt. Als Abszisse ist die Länge des Leimzylinders, als Ordinate die diffundierte Menge eingetragen. Soweit Kontrollreihen vorliegen, wurde das Mittel aus den entsprechenden Zahlen genommen mit wenigen Ausnahmen, wo bei offenbar fehlerhaften Werten nur der richtig erscheinende gewählt wurde; die nicht berücksichtigten Werte sind in den Tabellen mit einem Stern bezeichnet. Von der graphischen Darstellung der ersten Reihe des ersten Versuchs wurde wegen des Fehlens mehrerer Werte Abstand genommen. Schließlich muß beim Vergleich der Kurven noch in Betracht gezogen werden, daß infolge des höheren spezifischen Gewichtes der konzentrierteren Gallerten die entsprechenden reduzierten, vermittelst Division durch das Scheibengewicht gewonnenen Kochsalzwerte etwas zu niedrig ausfallen mußten. Der hierdurch bedingte Fehler beträgt gegen 15 Proz.; er läßt jedoch unsere Schlußfolgerungen unberührt. (Siehe Figur 1 auf S. 402 und Figur 2 auf S. 403.)

Bei der Betrachtung der Zahlen und Kurven fällt sogleich auf, daß die hineindiffundierte Salzmenge in den höher konzentrierten Gallerten schon in einer der Oberfläche näher gelegenen Schichte auf Null (bezw. den Grenzwert) sinkt als in den minder konzentrierten. Es ist dies der Fall:

	Versuchsreihe I:	Versuchsreihe II:
bei 10proz. Gelatine zwischen	45 und 50 mm	35 und 45 mm
„ 15 „ „	40 „ 45 „	—
„ 20 „ „	35 „ 40 „	25 und 30 mm
„ 25 „ „	30 „ 35 „	15 und 25 mm

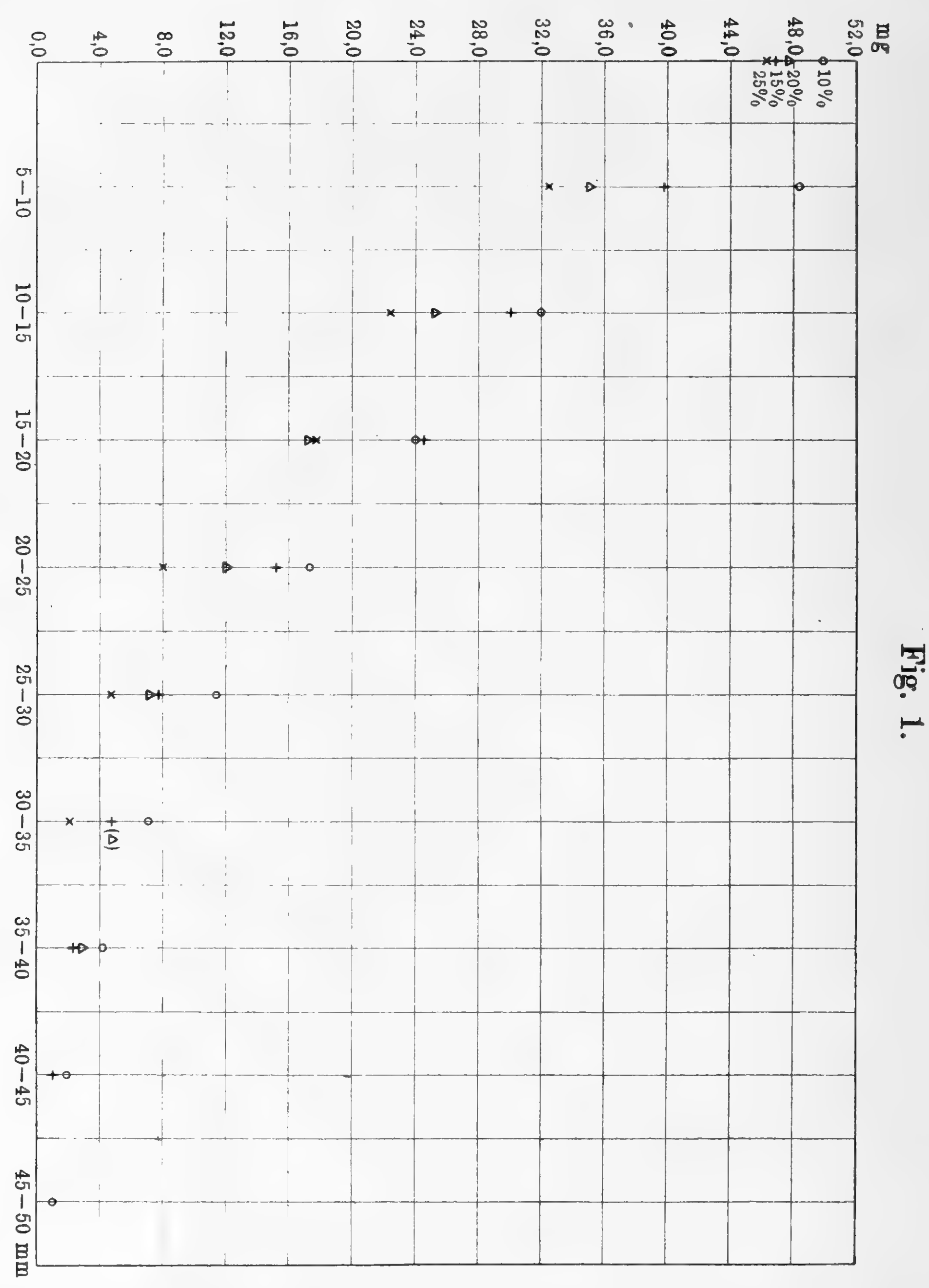
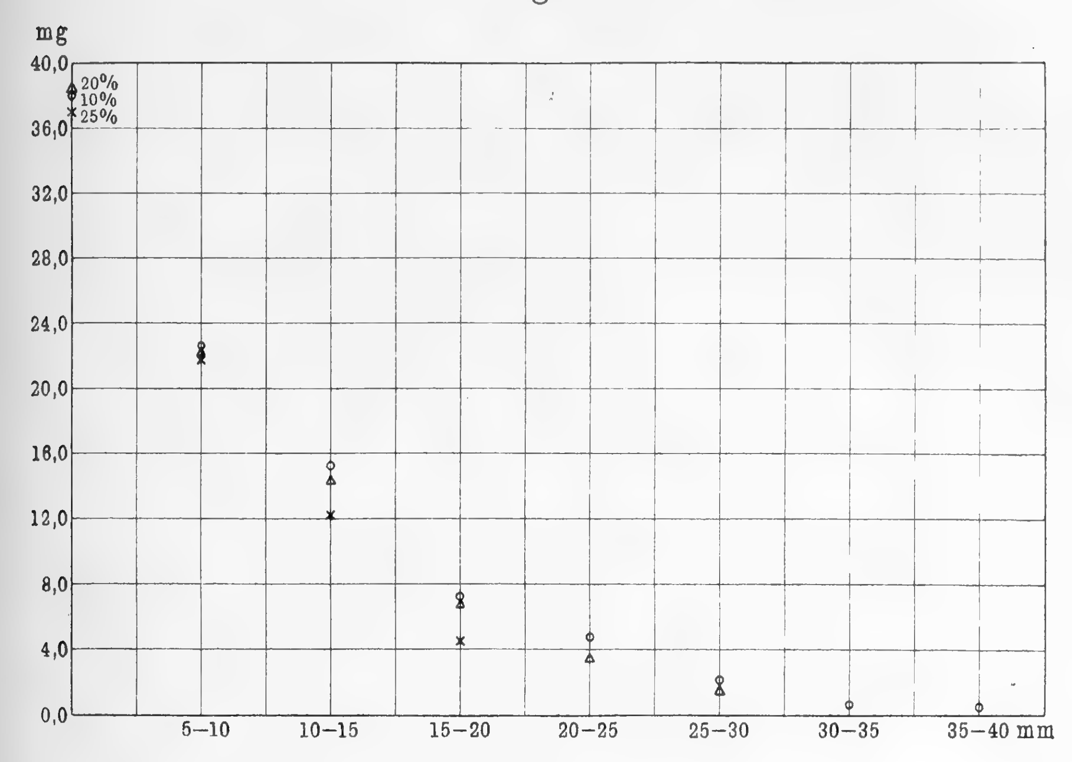


Fig. 1.

Der Unterschied des Diffusionsweges in 10proz. und in 25proz. Gelatinegallerte läßt sich nach diesen Zahlen auf 30 bis 50 Proz. schätzen. Das Gleiche geht aus der graphischen Darstellung hervor. Man sieht die Kurven für die konzentrierten Gallerten bedeutend steiler absinken als die der minder konzentrierten.

Es war wünschenswert, diese mit einer gewissen Fehlerbreite behafteten Ergebnisse durch eine auf anderem Wege gewonnene Versuchsreihe zu stützen. Ich benutzte dazu nach dem Vorgange von de Vries Kaliumchromatlösung, deren Eindringen in die Gelatinezylinder sich leicht verfolgen läßt.

Fig 2.



Es wurden Leimzylinder von 10, 15, 20 und 25 Proz. Gelatinegehalt, (auf lufttrockene Substanz bezogen, genauer 8,384; 13,657; 17,237; 21,690 Proz.) in n-Kaliumchromatlösung gebracht. Durch fließendes Wasser wurde die Temperatur während der Versuchszeit annähernd konstant auf 15° C gehalten. Der Diffusionsweg ergab sich:

	bei 10 Proz.,	15 Proz.,	20 Proz.,	25 Proz.
nach 24 Stunden zu	37 mm	31 mm	28 mm	24 mm
„ 48 „ „	49 „	42 „	37 „	33 „

Auch hier sehen wir eine Verkürzung des Diffusionsweges mit zunehmender Konzentration der Gallerte.

Auffällig war, daß die Färbung in den höher konzentrierten Gallerten dunkler erschien als in den dünneren, sodaß man den Eindruck gewann, als ob die Diffusionsmenge nicht in demselben Maße beeinflußt worden wäre wie der Diffusionsweg, indem eine stärkere Anhäufung von Chromat in den oberflächlichen Schichten die Verkürzung des Diffusionsweges zum Teil wieder auszugleichen schien. Allerdings ist es nicht ausgeschlossen, daß die dunklere Färbung teilweise auch durch Bildung von Dichromat bedingt war.

Um schließlich die Versuchsbedingungen noch nach einer anderen Richtung hin zu variieren, wurde als kolloidales Medium statt Gelatine Eiereiweiß gewählt.

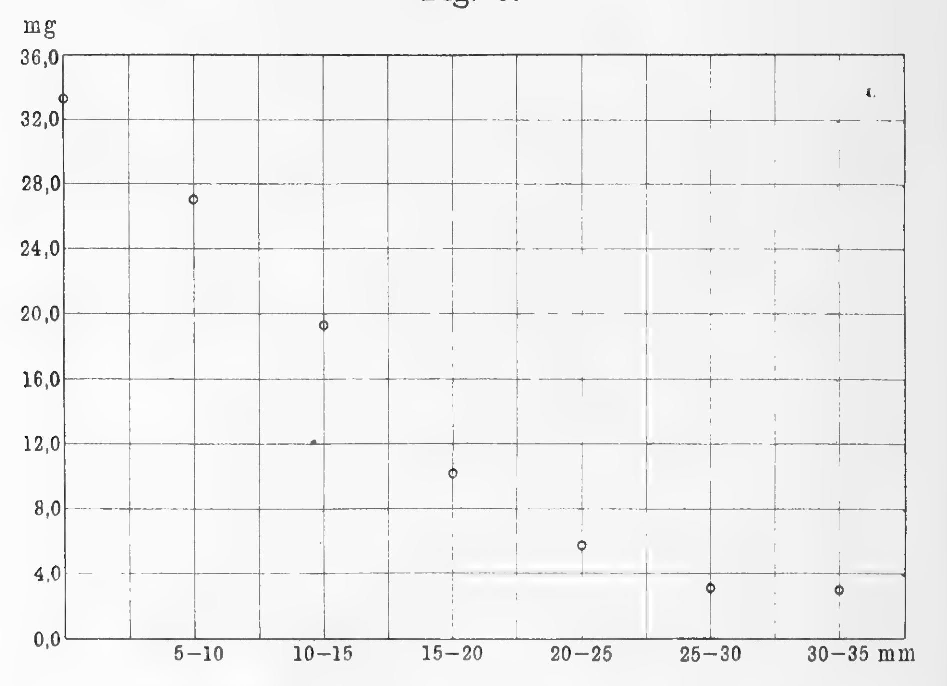
Das geschlagene Eierklar wurde durch längere Aufbewahrung im Vakuum luftfrei gemacht und dann vorsichtig, um jede Blasenbildung und eine dadurch bedingte Inhomogenität zu vermeiden, in Glaszylindern bei

80° koaguliert. Die Eiweißzylinder wurden, wie oben beschrieben, für 24 Stunden in Kochsalzlösung gebracht und dann in Scheiben von 5 mm Dicke zerlegt. Die Herausnahme der Eiweißzylinder aus dem Glase, d. h. die Loslösung von den Glasstücken wurde dadurch erleichtert, daß sie vorher in einer Kältemischung zum Gefrieren gebracht wurden. Die Scheiben wurden vorsichtig verascht und der Chlorgehalt der Asche durch Titration nach Volhard bestimmt. Da das Eierklar schon an sich Chlor enthält und zwar in einer Menge, die etwa 0,3 Proz. Chlornatrium entspricht, so konnten nur über dieser Grenze gelegene Werte, d. h. mehr als 3 mg pro 1 g Eiweiß auf die Diffusion von Chlornatriumlösung bezogen werden. Es ergaben sich folgende Werte:

n-NaCl-Lösung. Eiereiweißzylinder. Versuchsdauer 24 Stunden. Zimmertemperatur.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaCl-Gehalt in mg	NaCl-Gehalt auf 1 g Eiweiß umgerechnet in mg
1.	3,58	119,34	33,34
2.	3,11	84,24	27,10
3.	3,53	67,86	19,22
4.	3,67	47,97	10,27
5.	3,39	19,89	5,87
6.	3,59	11,70	3,26
7.	3,80	11,70	3,07
8.	3,28	9,36	2,85

Fig. 3.



Der Diffusionsweg hatte in diesem Falle zwischen 30 und 35 mm betragen. Da Eierklar 10 bis 13 Proz. Eiweiß enthält, bei unserm Versuche aber infolge der Aufbewahrung im Vakuum

ungefähr eine Konzentration von 15 Proz. erreicht hatte, so wären zum Vergleich die Versuche mit 15 Proz. Gelatinegallerte heranzuziehen, die ähnliche Werte zeigen. Bedenkt man, daß eine genaue Übereinstimmung wegen Nichtberücksichtigung der Temperatur kaum erwartet werden kann, so darf immerhin geschlossen werden, daß sich der Diffusionsvorgang in koaguliertem Eierklar sehr ähnlich dem in Gelatinegallerte verhält.

Die mitgeteilten Ergebnisse bestätigen im wesentlichen das Resultat der bezüglich des Diffusionswegs von Voigtländer angestellten Versuchsreihe, die er selbst aber nicht weiter berücksichtigt hat. Sie zeigen, daß der Diffusionsweg mit steigender Konzentration der Gallerte abnimmt und daß diese Verkürzung 30 bis 50 Proz. betragen kann. Falls im Protoplasma ähnliche Verhältnisse gegeben sind wie in Leimgallerten, so ist auch hier eine entsprechende Verzögerung des Diffusionsvorganges zu erwarten, die jedoch immer noch verhältnismäßig zu unbedeutend ist, um den Verlauf von Reaktionen innerhalb der Zelle erheblich zu beeinflussen. Ein anderes ist es, wenn es sich um Diffusionsprozesse in viel wasserärmeren Medien handelt wie z. B. in der Knorpel- oder Knochengrundsubstanz oder im elastischen Gewebe, namentlich aber in wasserarmen Membranen, mögen diese aus elastischer oder keratinartiger Substanz bestehen (Membran der Fettzellen, Schalenhaut der Eier usw.), oder von „lipoiden“ Stoffen gebildet werden (Lipoidschicht des Protoplasmas, Membran der Blutscheiben, Markscheide der Nerven usw.). Diese müssen, auch wenn sie sehr dünn sind, dem Hindurchdiffundieren gelöster Stoffe merkliche Hindernisse entgegensetzen. Insofern ist die Ungleichheit des Diffusionsweges physiologisch nicht ohne Bedeutung.

Zu der von Voigtländer gemachten Beobachtung, daß trotz ungleichen Diffusionsweges die Diffusionsmenge, d. h. die durch einen gegebenen Querschnitt hineindiffundierte Menge Substanz gleich bleibt, entschieden Stellung zu nehmen, gestatten die mitgeteilten Versuche nicht. Immerhin ist zu bemerken, daß in der ersten Versuchsreihe die Diffusionsmenge bei der 25 proz. Gallerte erheblich hinter den Werten bei den anderen Gallerten zurückbleibt, und auch in einem noch weiter unten mitzuteilenden Versuche scheint sich ein solcher Einfluß der Konzentration auf die Diffusionsmenge bemerkbar zu machen. Diese wenigen Zahlen können aber nicht genügende Beweiskraft beanspruchen und es bedarf diese Frage jedenfalls noch weiterer Prüfung.

Physiologisch ist dieser Umstand weniger von Bedeutung, da die Diffusionsprozesse im Organismus von einem anderen Faktor in so weitaus überwiegendem Maße beeinflußt werden, daß dagegen die durch Wasserarmut bedingte Verschiedenheit ganz zurücktritt: das ist die selektive Absorption bestimmter Stoffe durch die der Osmose dienenden Membranen.

III. Verschiedenheiten in der Diffusionsmenge einiger Natronsalze.

Die älteste Beobachtung, die lehrt, daß für die osmotischen Vorgänge die selektive Absorption der Gallerte bzw. einer kolloidalen Membran von allergrößter Bedeutung ist, dürfte jene sein, daß ein Gemenge von Alkohol und Wasser, wenn es in einer Tierblase der Luft ausgesetzt wird, viel mehr Wasser als Alkohol einbüßt. Dieses Verhalten erklärt sich dadurch, daß die Tierblase viel mehr Wasser aufnimmt als Alkohol, so daß an der Außenfläche für die Abgabe des Wassers bedeutend günstigere Bedingungen bestehen als für die des Alkohols. In neuerer Zeit sind derartige Fälle von spezifischer Absorption bei verschiedenen Gelegenheiten beobachtet worden.

Auf einen solchen Fall von spezifischer Absorption sind auch die nachstehend mitgeteilten Versuchsergebnisse zurückzuführen, die zeigen, daß das Selektionsvermögen der Gallerten sich auch auf anorganische Salze erstreckt.

Es wurde nämlich die Frage geprüft, wie sich verschiedene Salze bezüglich ihrer Diffusibilität gegenüber derselben Gallerte verhalten.

Zur Verwendung kamen Lösungen von Chlor-, Brom- und Jodnatrium und Natriumsulfat mit einem Gehalt von $^1/_2$ Mol im Liter. In diese Flüssigkeiten wurden Gelatinezylinder wie oben beschrieben für 24 Stunden gebracht. Von einem Zerlegen in einzelne Scheiben wurde abgesehen, vielmehr der Salzgehalt im ganzen bestimmt und zwar gewichtsanalytisch als Baryumsulfat und Halogensilber. Die Bestimmung gestaltete sich dadurch schwierig, daß die kolloidal ausfallenden Niederschläge stundenlang erwärmt werden mußten, bis sie sich vollständig abgesetzt hatten. Auch dann waren die Niederschläge noch so außerordentlich fein, daß sie zunächst teilweise durch das Filter gingen und erst bei wiederholtem Filtrieren zurückgehalten wurden. Aus diesem Umstande erklären sich die nicht unbedeutenden Abweichungen der Kontrollwerte von einander. An den Zahlen wurde dann noch wegen des Chlor- und Sulfatgehalts der käuflichen Gelatine eine Korrektion angebracht. Es wurden zwei Versuchsreihen angesetzt, die zweite mit Kontrollproben.

Nachfolgend die Ergebnisse, bei denen die diffundierte Salzmenge in Molen ausgedrückt wird.

Versuchsreihe I. $^{1}/_{2}$ Mol-Lösungen von NaCl, NaBr, NaJ, Na_2SO_4. 10 Proz. Gelatine. Versuchsdauer 24 Stunden. Zimmertemperatur.

NaCl	= 0,3124 g	= 5340 . 10^{-6}	Mol.
NaBr	= 0,2419 „	= 2349 . 10^{-6}	„
NaJ	= 0,4477 „	= 2987 . 10^{-6}	„
Na_2SO_4	= 0,3390 „	= 2385 . 10^{-6}	„

Versuchsreihe II. $^{1}/_{2}$ Mol-Lösungen von NaCl, NaBr, NaJ, Na_2SO_4. 15 Proz. Gelatine. Versuchsdauer 24 Stunden. Zimmertemperatur.

NaCl	= 0,3254 g	= 5562 . 10^{-6}	Mol.	0,3044 g	= 5203 . 10^{-6}	Mol.
NaBr	= 0,2742 „	= 2662 . 10^{-6}	„	0,3106 „	= 3016 . 10^{-6}	„
NaJ	= 0,3925 „	= 2618 . 10^{-6}	„	0,4482 „	= 2990 . 10^{-6}	„
Na_2SO_4	= 0,2951 „	= 2076 . 10^{-6}	„	0,3017 „	= 2122 . 10^{-6}	„

Betrachten wir die in Mol umgerechneten Werte, so fällt auf den ersten Blick die hohe Zahl für Chlornatrium gegenüber denen der anderen Salze auf. Sie ist beinahe doppelt so groß wie diese. In Wasser ist die Diffusionskonstante für Jodide, Bromide und Chloride der Alkalien nahezu die gleiche, die der Sulfate etwas kleiner, in Übereinstimmung mit der Diffusionstheorie von Nernst, nach der die Diffusionskonstante der Jonenwanderungsgeschwindigkeit parallel geht. Diese ist für Br' und J' sogar noch etwas größer als für Cl', kleiner für SO_4''. Bei Natriumsulfat kommt ferner noch die geringere Dissoziation in Betracht. Bei der Diffusion in Gelatinegallerte sehen wir nun dem gegenüber eine erhebliche Bevorzugung des Chlornatriums. Interessant ist, daß Höber*) bei seinen Resorptionsversuchen ebenfalls eine bedeutend höhere Resorptionsgeschwindigkeit für Chlornatrium als für Natriumjodid gefunden hat. Durch unsere Versuchsergebnisse fällt auf diese Erscheinung ein gewisses Licht.

Da sich so eine besondere Beziehung des Kochsalzes zur Gelatine gezeigt hatte, erschien es zweckmäßig, an einem indifferenten Salze, nämlich Bromnatrium, nochmals zu prüfen, ob für dieses die Diffusionsgeschwindigkeit durch Gelatine ebenfalls beeinflußt wurde oder ob etwa die für das Kochsalz gefundene Verkürzung des Diffusionsweges nur durch eben jene besonderen Beziehungen bedingt sei.

Der Versuch wurde in gleicher Weise wie beim Kochsalz durchgeführt. Es kam wieder eine Lösung mit einem Gehalt von 1 Mol im Liter zur Verwendung. Die Versuchsdauer betrug auch hier 24 Stunden. Die Temperatur war Zimmertemperatur. Die Gallerten hatten einen Gelatinegehalt von 10 Proz. und 25 Proz. (genau 9,149 Proz. und 25,655 Proz.). Die Grenzwerte, die durch den hier als Bromnatrium erscheinenden Kochsalzgehalt der käuflichen Gelatine bedingt sind, liegen für 10proz. Gallerte bei 1,3 mg, für 25proz. Gallerte bei 3,2 mg.

*) Höber, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe (1902) S. 192.

n-NaBr-Lösung. Versuchsdauer 24 Stunden. Zimmertemperatur.

10proz. Gallerte.

	Scheibengewicht in g	Absoluter NaBr-Gehalt in mg	NaBr-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	3,29	197,8	60,1
2.	2,67	125,7	47,1
3.	2,53	78,3	30,9
4.	3,57	53,6	15,0
5.	3,17	18,5	5,9
6.	3,39	10,3	3,0
7.	3,79	6,2	1,6
8.	3,28	1,3	1,3
1.	3,60	210,1	58,4
2.	2,56	115,4	45,1
3.	3,54	84,5	23,9
4.	3,70	57,7	15,6
5.	3,43	20,6	6,6
6.	3,78	12,4	3,3
7.	3,82	4,1	1,1

25proz. Gallerte.

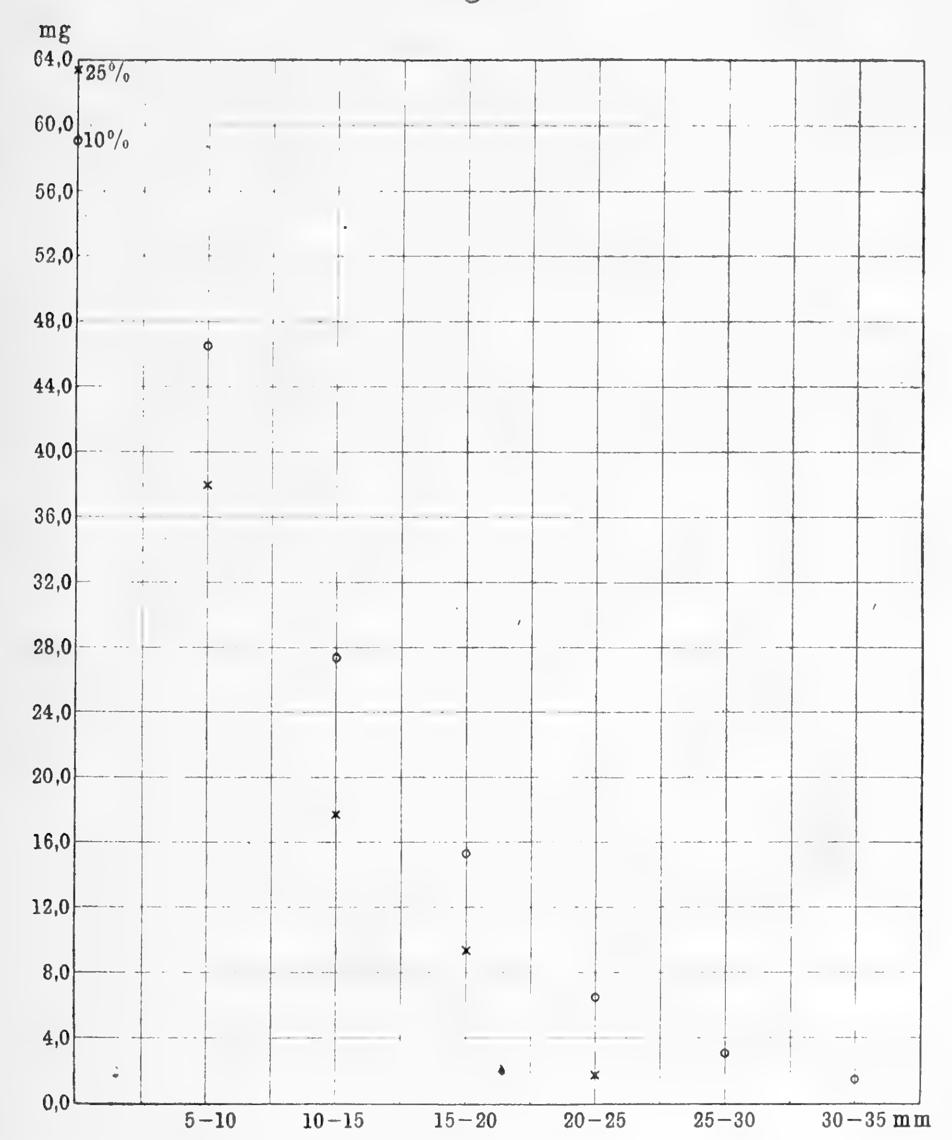
	Scheibengewicht in g	Absoluter NaBr-Gehalt in mg	NaBr-Gehalt auf 1 g Gelatine umgerechnet in mg
1.	3,02	191,6	63,4
2.	3,91	154,5	39,5
3.	4,09	72,1	17,6
4.	4,83	41,2	8,5
5.	4,37	6,2	1,4
1.	3,72	183,4	49,3
2.	3,67	133,9	36,5
3.	4,30	70,1	16,3
4.	4,21	43,3	10,3
5.	4,48	8,2	1,8

Die Kurven wurden in derselben Weise, wie oben geschildert, gezeichnet. Von den Reihen mit 25proz. Gallerte wurde der erste Wert der zweiten Reihe nicht benutzt, da bei der Bestimmung ein Verlust untergelaufen war. Andererseits erscheint der erste Wert der zweiten Reihe etwas zu hoch, weil die betreffende Scheibe, wie aus dem Gewicht hervorgeht, etwas dünn ausgefallen war und durch den Wegfall der tieferen Schicht der Durchschnittsgehalt sich höher stellen mußte.

Im ganzen zeigen die Kurven ein ähnliches Verhalten wie bei den Kochsalzversuchen. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Diffusionsweges zwischen den beiden Konzentrationen vorhanden. In die 10proz. Gallerte ist das Natriumbromid 30 bis 35 mm tief hineingedrungen, in die 25proz. dagegen nur 15 bis 20 mm tief. Es würde sich demnach auch

hier um einen Unterschied von ungefähr 50 Proz. handeln. Die Kurven erscheinen im ganzen etwas steiler, weil die obersten Schichten nahezu denselben Salzgehalt besitzen wie die Versuchslösung und daher bei dem großen Molekulargewicht des Bromnatriums hohe Werte aufweisen müssen.

Fig. 4.



Da wegen der Ungleichheit der Temperaturen ein sicherer Vergleich nicht möglich ist, so muß es unentschieden bleiben, ob der selektive Einfluß der Gallerte den Diffusionsweg in gleichem Maße trifft wie die Diffusionsmenge. Es wäre wünschenswert, diesen Punkt unter ganz vergleichbaren Bedingungen nochmals der Prüfung zu unterwerfen.

Beachtenswert ist vielleicht noch, daß in dieser Versuchsreihe sich ein Einfluß der Gallertenkonzentration auch auf die Diffusionsmenge ziemlich deutlich geltend macht. Die in die ersten sechs Scheiben hineindiffundierte Bromnatriummenge beträgt bei den 10proz. Gallerten (unkorrigiert) 484 und 501 mg, während in den 25proz. Gallerten sich nur ein Salzgehalt von 459 und 431 mg ergeben hat. Berücksichtigt man außerdem noch, daß der für den Kochsalzgehalt der käuflichen Gelatine zu machende Abzug bei den konzentrierten Gallerten ungefähr zweieinhalbmal so groß ist wie bei den 10proz., so scheint doch der Unterschied erheblich über die Fehlergrenze hinauszugehen.

Von welcher physiologischen Bedeutung die selektive Permeabilität von Membranen für physiologische Vorgänge sein muß, ist ohne weiteres einzusehen. Ich möchte in dieser Beziehung hier nur hervorheben, daß der individuelle Charakter des Stoffwechsels, der die Zellen der verschiedenen Organe zu bestimmten chemischen Leistungen befähigt, nicht allein von spezifischen in den Zellen wirksamen Einrichtungen abhängt, sondern auch davon, daß die Zellen vermöge eines ihrer Oberfläche zukommenden Auswahlvermögens bestimmte ihnen durch das Blut zugeführte Stoffe mit Leichtigkeit aufzunehmen, andere fernzuhalten vermögen. Wie sehr solche Vorstellungen für die Deutung biologischer Vorgänge verwertbar sind, ist gelegentlich von Hofmeister, Spiro, Höber und anderen dargetan worden.

Als Ergebnis vorstehender Untersuchung ist hervorzuheben, daß sich im Gegensatz zu der jetzt meist vertretenen Meinung ein Einfluß der Konzentration kolloidaler Medien auf in ihnen stattfindende Diffusionsvorgänge herausgestellt hat und zwar in dem Sinne, daß bei höheren Konzentrationen der diffundierende Stoff in gleicher Zeit weniger tief in die Gallerte eindringt (der Diffusionsweg nimmt kleinere Werte an), während die in der Zeiteinheit hineindiffundierende Gewichtsmenge (die Diffusionsmenge) keine entsprechende Abnahme erfährt, daß aber andererseits die Diffusionsmenge in hohem Maße von dem selektiven Absorptionsvermögen der Gallerte abhängig ist.

Als nächste einschlägige Aufgabe ergibt sich hieraus, festzustellen, ob einfache berechenbare Beziehungen zwischen Diffusionsmenge und Diffusionsweg gegeben sind.

XXI.

Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn*).

Von Dr. **Gustav Embden,** Vorstand des chemischen Laboratoriums am städt. Krankenhause und Dr. **Heinrich Reese** (Basel).

Aus dem städtischen Krankenhause zu Frankfurt am Main, Oberarzt Professor Dr. von Noorden.

Trotzdem bei der Verdauung der Eiweißkörper im Darmkanal und allem Anschein nach auch beim intrazellulären Eiweißabbau sehr erhebliche Mengen von Aminosäuren entstehen, hat man den Übertritt einfacher Aminosäuren in den normalen Harn bisher nicht feststellen können, obschon man ihren Nachweis mit den verschiedensten Methoden versuchte.

Auch mittelst einer neueren von Fischer und Bergell**) angegebenen Methode, bei welcher die Aminosäuren durch Schütteln ihrer alkalischen Lösung mit β-Naphthalinsulfochlorid in β-Naphthalinsulfaminosäuren übergeführt werden, konnten im normalen Harn Aminosäuren nicht oder nur in Spuren nachgewiesen werden [Abderhalden und Bergell***), Ignatowski†), Erben††)].

Wohl aber wurden unter verschiedenartigen abnormen Bedingungen im Harn auftretende Aminosäuren in die β-Naphthalinsulfone übergeführt und als solche identifiziert. So gelang es

*) Ein Teil des Inhalts der vorliegenden Untersuchung, sowie derjenige der nachfolgenden Arbeit von Plaut und Reese wurde bereits von Embden auf dem Kongreß für innere Medizin zu Wiesbaden 1905 mitgeteilt.

) Fischer und Bergell, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **35 (1903).

***) Abderhalden, E. und Bergell, P., Der Abbau der Peptide im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 9 (1903).

†) Ignatowski, A., Über das Vorkommen von Aminosäuren im Harn, vorzugsweise bei Gicht. Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 388 (1904).

††) Erben, Franz, Zur Bestimmung der Aminosäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 323 (1904).

Abderhalden*) in einigen Fällen von Cystindiathese das Cystin als Naphthalinsulfoverbindung zu gewinnen; im Harn eines an Arteriosklerose, Myocarditis und Diabetes leidenden Patienten fand derselbe Autor**) mittelst derselben Methode eine nicht unerhebliche Menge Tyrosin. Aus dem Urin phosphorvergifteter Kaninchen gewannen Abderhalden und Bergell***) ein Gemenge von Naphthalinsulfoaminosäuren, aus dem die Verbindung des Glykokolls isoliert werden konnte†). Vor allem aber führte Ignatowski††) mittelst der Naphthalinsulfochloridmethode den Nachweis, daß in verschiedenen Krankheitszuständen, besonders bei der Gicht und dann auch bei Leukämie und Pneumonie Aminosäuren und speziell Glykokoll im Harne auftreten können.

Als wir angeregt namentlich durch Ignatowskis Ergebnisse zu Beginn des vorigen Winters beschlossen, das Verhalten der Aminosäureausscheidung in verschiedenen Krankheitszuständen zu untersuchen, schienen uns einige orientierende Vorversuche am normalen Harne notwendig.

Bei diesen und auch bei den späteren Versuchen diente uns die Modifikation, in der Ignatowski die Fischer-Bergellsche Methode anwandte, als Grundlage.

Wir entfernten demnach zuerst die mit Bleiacetat fällbaren Substanzen aus dem Harn, das überschüssige Blei wurde durch Schwefelwasserstoff, letzterer nach Abtrennung des Sulfidniederschlages durch einen Luftstrom fortgeschafft.

Durchaus notwendig erschien uns die vollständige Beseitigung der Hippursäure. Wir haben diese Beseitigung auf verschiedene Weise bewerkstelligt; in einer Reihe von Versuchen extrahierten wir den Harn nach Bleifällung, Entbleiung und Ansäuren mit Mineralsäure 16 bis 20 Stunden im Kutscher-Steudelschen Extraktionsapparat mit Äther. Bei den späteren Versuchen schüttelten wir den in gleicher Weise vorbereiteten Urin sechsmal mit etwa einem Fünftel seines Volumens Essigäther je 20 bis

---

*) Abderhalden, E., Familiäre Cystindiathese. Zeitschr. f. physiol. Chemie **38**, 559.

) Abderhalden, E., Aufbau und Abbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie **44, 41 (1905).

***) Abderhalden, E. und Bergell, P., Über das Auftreten von Monaminosäuren nach Phosphorvergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 465 (1903).

†) Auf die durch verschiedene Autoren erfolgte Anwendung der Naphthalinsulfochloridmethode zum Nachweis verfütterter Aminosäuren und dergl. im Harn wird in der auf diese folgenden Arbeit einzugehen sein.

††) Ignatowski, a. a. O., S. 389 ff.

30 Minuten auf der Schüttelmaschine. Die Hauptmasse des Essigäthers wurde alsdann durch dreimaliges Schütteln mit großen Äthermengen entfernt; wir haben uns natürlich davon überzeugt, daß auf diese Weise die Fortschaffung der Hippursäure bis auf Spuren gelingt.

Von einer Einengung des Harns haben wir in allen späteren Versuchen abgesehen. Für eine möglichst quantitative Ausbeute mag sie notwendig sein, für den einfachen, qualitativen Nachweis der Reaktionsprodukte mit β-Naphthalinsulfochlorid ist sie unnötig und vielleicht nachteilig.

Nach diesen Vorbereitungen wurde der äthergesättigte Harn alkalisch gemacht und mit einer 10proz. ätherischen Lösung von β-Naphthalinsulfochlorid geschüttelt.

Bald stellte sich heraus, daß für den Verlauf der Reaktion der Alkaleszenzgrad des Harnes von größter Bedeutung ist. Schüttelt man einen normalen Harn, wie das in den bisherigen Untersuchungen zumeist geschah, bei schwach alkalischer Reaktion mit dem Reagens, so treten keine oder höchstens Spuren von Produkten auf; bei Anwendung stärkerer Alkaleszenzgrade ist hingegen die Menge der erhaltenen Reaktionsprodukte stets eine sehr erhebliche.

Wir haben in unseren Versuchen dem Harn zunächst soviel Natronlauge hinzugefügt, daß blaues Lackmuspapier eben nicht mehr gerötet wird. Man kann über diese untere Grenze der amphoteren Zone mit dem Alkalizusatz noch erheblich hinausgehen, ohne daß beim Schütteln mit Naphthalinsulfochlorid merkliche Mengen von Reaktionsprodukten gebildet werden. Der Alkalizusatz muß so reichlich sein, daß empfindliches rotes Lackmuspapier nicht nur violett sondern intensiv blau gefärbt wird. Die Größe des zur Erzielung dieser stark alkalischen Reaktion nötigen Alkalizusatzes ist naturgemäß in den einzelnen Fällen verschieden. Setzt man dem Harn zunächst soviel Natronlauge hinzu, bis blaues Lackmuspapier eben nicht mehr gerötet wird, so sind im allgemeinen weitere etwa 20 bis 40 ccm Normalnatronlauge aufs Liter dem Harn zuzufügen. Doch scheint nach unseren bisherigen Erfahrungen etwas stärkerer Alkalizusatz die Reaktionsbedingungen nicht zu verschlechtern.

Der Einfluß der Alkaleszenz auf das Zustandekommen der Reaktion werde durch folgendes Versuchsbeispiel erläutert:

Eine größere Menge Urin wird nach der üblichen Vorbehandlung schwach alkalisch gemacht und nun zu folgenden Versuchen verwendet:

1. 450 ccm des Urins werden ohne weiteren Alkalizusatz mit einer bestimmten Menge Reagens einige Stunden geschüttelt. Keine Reaktionsprodukte.

2. 450 weitere ccm mit 2 ccm einer Natronlauge von etwa 7 Proz. versetzt (rotes Lackmuspapier wird violett gefärbt) und ebenso behandelt. Keine Reaktionsprodukte.

3. Eine dritte Menge von 450 ccm mit 5 ccm derselben Lauge versetzt (Reaktion gegen Lackmuspapier intensiv blau). Nach dem Schütteln reichliche Reaktionsprodukte.

4. Eine weitere Portion von 450 ccm erhält einen Zusatz von 10 ccm der Natronlauge und liefert beim Schütteln mit dem Reagens ebenfalls reichliche Mengen von Naphthalinsulfoverbindungen.

Von dem Reagens fügten wir dem alkalisch gemachten Harn zunächst etwa 4 g pro Liter hinzu.

Bei unseren anfänglichen Versuchen ließen wir den Harn im allgemeinen etwa 9 Stunden bei niederer Außentemperatur (7 bis 11°) mit β-Naphthalinsulfochlorid schütteln. Während dieser Zeit wurde die Reaktion des Harns öfters kontrolliert; ist sie nicht mehr stark sondern nur noch schwach alkalisch, so wird eine neue Menge Alkali und auch etwas frisches Reagens hinzugefügt. Schließlich wird die ätherische, die Hauptmasse des überschüssigen Reagens enthaltende Schichte im Scheidetrichter abgetrennt, und der bei dieser ersten Schüttelung meist nur wenig getrübte Harn filtriert. Das klare Filtrat wird wieder in den Scheidetrichter gebracht und entweder zur Beseitigung kleiner Reste von in der äthergesättigten Flüssigkeit gelöstem β-Naphthalinsulfochlorid mehrfach mit kleinen Äthermengen geschüttelt, wobei allerdings ein gewisser Verlust an stickstoffhaltigen Reaktionsprodukten eintritt, oder sofort mit einem reichlichen Überschuß von Salzsäure versetzt. Stets tritt jetzt ein dichter wolkiger Niederschlag auf, der der Flüssigkeit ein völlig undurchsichtiges milchiges Aussehen gibt.

Nach dem Vorgang von Ignatowski wird der Harn mit Äther (etwa ein Sechstel des Volumens) versetzt und im Scheidetrichter geschüttelt; der Niederschlag verschwindet meist schon bei der ersten Ausschüttelung nahezu völlig. Der Äther wird abgetrennt und die Ausschüttelung mit neuen Ätherportionen noch zweimal wiederholt.

Die vereinigten Ätherextrakte werden mehrfach mit kleinen Wassermengen gewaschen, filtriert und entweder im Vakuum eingeengt oder der spontanen Verdunstung in gewogenen Schälchen überlassen. In vielen Fällen gelangte die Substanz erst nach nochmaliger Auflösung in Alkohol oder Äther zur Wägung. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurde die Substanz bei 100° oder im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet*).

*) Beim Trocknen wird der Niederschlag zum Teil in Äther und auch in Alkohol unlöslich.

Über die Menge der gewinnbaren Reaktionsprodukte wollen wir hier nur einige kurze Angaben machen. Bei unseren Versuchen am normalen Harn haben wir, wie bereits erwähnt, meist nur etwa 9 Stunden bei sehr niedriger Außentemperatur unter mehrmaligem Alkalizusatz geschüttelt. Während dieser Zeit geht die Reaktion auch nicht annähernd zu Ende. Immerhin ist die Menge der bei dieser Schüttelung erhaltenen Produkte oft sehr beträchtlich; sie kann, auf das Tagesquantum Harn eines normalen Menschen berechnet, weit mehr als 2 g betragen. Wiederholt man nach jeweiliger Entfernung der Reaktionsprodukte die Behandlung mit Naphthalinsulfochlorid bei stark alkalischer Reaktion, so erhält man noch mehrmals erhebliche Mengen von Naphthalinsulfoverbindungen.

Neuerdings führen wir die Behandlung mit β-Naphthalinsulfochlorid in der Art aus, daß wir den Harn zunächst 2 Tage lang unter öfterem Alkali- und Reagenszusatz (4 bis 6mal pro Tag) und bei einer nicht zu niedrigen Temperatur (am besten etwa 30°) schütteln lassen. Bei weitem die Hauptmasse der Produkte wird dann während dieser ersten Schüttelung gewonnen. Eine zweite unter den gleichen Bedingungen vorgenommene, gleich lang andauernde Behandlung fördert dann nur noch geringe Mengen, eine dritte gewöhnlich höchstens Spuren von Produkten zutage.

In 6 Versuchen, die wir mit gemessenen aliquoten Teilen der Harntagesmenge von 5 gesunden Personen ausführten, erhielten wir auf die Tagesmenge berechnet, folgende Quantitäten von Reaktionsprodukten:

Versuch I.

Tagesquantum des Harns: 1250 ccm. Die Vorbehandlung geschieht in der oben geschilderten Weise. Nach der Entbleiung werden 600 ccm Harn abgemessen und weiter verarbeitet. Nach Abtrennung des β-Naphthalinsulfamids (siehe unten) wurden aus diesem Harnquantum 1,259 g Reaktionsprodukte gewonnen. Dies entspricht **2,62** g in der Tagesmenge.

Versuch II.

Tagesquantum des Harns: 950 ccm. Nach der Entbleiung weiter verarbeitet: 425 ccm. Gewonnene Menge der Reaktionsprodukte (ohne β-Naphthalinsulfamid): 1,225 g, entsprechend **2,74** g in der Tagesmenge.

Versuch III.

Harnmenge 1150 ccm, verarbeitetes Harnquantum 500 ccm. Gewonnene Menge von Reaktionsprodukten: 0,641 g, entsprechend **1,48** g in der Tagesmenge.

Versuch IV.

Harn von derselben Versuchsperson. Tagesmenge 1150 ccm. Verarbeitet 500 ccm. Gewonnene Menge von Reaktionsprodukten: 0,782 g, entsprechend **1,73** g in der Tagesmenge.

Versuch V.

Harnmenge 1730 ccm. Verarbeitet 500 ccm. Gewonnene Menge von Produkten: 0,810 g, entsprechend **2,80** g in der Tagesmenge.

Versuch VI.

Harnmenge 950 ccm. Gewonnene Menge von Reaktionsprodukten: 0,693 g, entsprechend **1,32** g in der Tagesmenge.

Wie man sieht, lassen sich aus normalem Harn sehr erhebliche Mengen von Naphthalinsulfoverbindungen gewinnen. Es handelt sich hier übrigens nur um Minimalwerte, da wir einstweilen keineswegs die Berechtigung haben, die von uns angewandte Methode als quantitativ zu betrachten.

Eigenschaften des Rohproduktes.

Das gewonnene Rohprodukt macht von von vornherein den Eindruck eines Gemenges. Es ist zunächst zum größten Teil amorph und wird auch bei längerem Stehen nie völlig kristallinisch. An der Luft färbt sich die anfänglich gelbe oder hellbraune Masse allmählich dunkelbraun oder braunrot. Beim Übergießen mit starken Säuren tritt intensiv rote Färbung ein. Das Produkt hat etwa die Konsistenz einer sehr harten Salbe. Es hat keinen scharfen Schmelzpunkt, wird aber bei Wasserbadtemperatur dünnsirupös, um beim Erkalten wieder zu einer dunkelbraunen zähen Masse zu erstarren. In heißem Wasser ist es schwer löslich, es fällt daraus beim Erkalten als feine, homogene Trübung aus.

Im kalten Alkohol von 95 Proz. ist die Substanz leicht löslich, besser noch in heißem Alkohol. Auch in Äther löst sich das frisch gewonnene Produkt leicht, nach dem völligen Eintrocknen wird es weniger ätherlöslich. Die alkoholische Lösung der Substanz drehte in den untersuchten Fällen die Ebene des polarisierten Lichtes schwach nach links. In verdünntem Ammoniak ist das Substanzgemenge größtenteils löslich, worauf weiter unten noch näher einzugehen sein wird.

Beim Verbrennen auf dem Platinblech gibt die Substanz intensiven Horngeruch.

In einer größeren Reihe von Fällen haben wir den Stickstoffgehalt der gewonnenen Produkte nach Kjeldahl ermittelt.

Die völlig getrocknete Substanz mußte ihrer zähen Konsistenz wegen in alkoholischer Lösung in den Kjeldahlkolben übergeführt werden. Die Resultate eines Teils dieser Stickstoffbestimmungen sind aus der beifolgenden Tabelle ersichtlich. Die Ergebnisse der hier nicht aufgeführten Analysen waren ganz ähnliche.

	1	2	3
	Menge der zur Stickstoffbestimmung verwandten Substanz g	Gefundene Stickstoffmenge in g	Gefundene Stickstoffmenge in Proz.
1	0,431	0,0188	4,36
2	0,434	0,0188	4,32
3	0,383	0,0168	4,39
4	0,3276	0,0157	4,79
5	0,4479	0,0202	4,50
6	0,77 . .	[0,0366]	[4,3]
7	0,5431	0,0277	5,10
8	0,3205	0,0145	4,55
9	0,9844	0,0434	4,41
10	0,6366	0,0291	4,57
11	0,6059	0,0269	4,44

In der Tabelle gibt die Kolonne I Aufschluß über die Menge der zur Stickstoffbestimmung verwandten Substanz, Kolonne II und III geben den Stickstoffgehalt in g und Prozenten wieder. Das Material zu den Bestimmungen 1 bis 6 stammte von derselben völlig gesunden Versuchsperson. Aliquote Teile des Harns von sechs verschiedenen Tagen wurden getrennt in der oben geschilderten Weise verarbeitet. Der Harn zu den Bestimmungen 7 bis 11 rührte von mehreren anderen Personen her. In Versuch 7 handelte es sich ebenfalls um den Urin eines Gesunden; die Verarbeitung war nur insofern eine von der oben geschilderten abweichende, als der Harn nach dem Schütteln mit dem Reagens zunächst zur völligen Beseitigung noch gelösten Naphthalinsulfochlorids wiederholt mit großen Mengen Äther bei alkalischer Reaktion ausgeschüttelt wurde.

Das Material zur Bestimmung 8 stammte von einem an Muskeldystrophie leidenden Patienten, das zu den Bestimmungen 9 bis 11 benutzte aus verschiedenen Harnmischungen, die auf einer Abteilung für Rekonvaleszente gewonnen wurden.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist der Stickstoffgehalt der Produkte ein schwankender, doch halten sich die Schwankungen in ziemlich engen Grenzen.

Der ähnliche Stickstoffgehalt der aus verschiedenen Darstellungen erhaltenen Produkte gibt im übrigen nur einen Hinweis darauf, daß die letzteren von einigermaßen gleichartiger Beschaffenheit waren, ohne über diese Beschaffenheit selbst etwas auszusagen.

Trennungs- und Spaltungsversuche.

Endgültigen Aufschluß über die Natur der gewonnenen Produkte konnte natürlich nur die Reindarstellung der verschiedenen Substanzen des Gemenges liefern.

Diese Trennung erwies sich als eine ziemlich schwierige Aufgabe, die wir bisher nur zu einem Teile lösen konnten.

Wir gewannen bisher aus den Reaktionsprodukten nur das β-Naphthalinsulfoglycin und das Amid der β-Naphthalinsulfosäure.

Die hierbei angewandte Methode, die sich zum Teil an die Angaben von Abderhalden und Bergell anlehnte, war folgende:

Das zum größten Teil amorphe Gemenge der Reaktionsprodukte wird mit der etwa 10 fachen Wassermenge übergossen und dann vorsichtig mit Ammoniak versetzt. Die Hauptmasse der Substanz geht sofort in Lösung; es hinterbleibt lediglich ein nahezu farbloser, zum Teil äußerst feinkörniger kristallinischer Anteil. Die zunächst noch nicht von dem ungelösten Rückstand getrennte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis die Reaktion annähernd neutral ist und bleibt nun bis zum nächsten Tage bei Zimmertemperatur stehen. Bei öfters wiederholter Filtration durch ein kleines Filter gelingt es stets, ein klares oder doch nur leicht opaleszentes Filtrat zu erhalten. Der Filterrückstand wird mehrfach mit kaltem Wasser gewaschen und aus sehr viel heißem Wasser umkristallisiert. Die leicht erhältlichen, rein weißen Kristalle haben die Form zarter Blättchen und sehen mikroskopisch völlig einheitlich aus. Die Substanz schmilzt bei 216 bis 217°. Es handelt sich demnach um das bekannte Amid der β-Naphthalinsulfosäure.

Das die leicht löslichen Ammonsalze enthaltende, völlig oder nahezu völlig amidfreie Filtrat wird nun zweckmäßiger Weise nochmals angesäuert, und der entstehende, dickwolkige Niederschlag sofort mit Äther aufgenommen; gewöhnlich hinterbleibt beim Ausschütteln ein schmieriger, brauner Rückstand, den wir bisher nicht weiter verarbeitet haben. Die Ausschüttelung mit Äther wird noch ein- oder zweimal wiederholt, die wiederum mit wenig Wasser gewaschenen, vereinigten Ätherextrakte werden zur Verdunstung gebracht. Der Rückstand wird neuerdings mit Wasser übergossen, in Ammoniak gelöst und das überschüssige Ammoniak in der Wärme verjagt.

Die so gewonnene, nahezu neutrale Flüssigkeit gibt mit Lösungen von Baryumchlorid, Calciumchlorid, Kupfersulfat und mit einer Reihe anderer Metallsalze voluminöse Fällungen.

Um aus der Lösung der Ammonsalze das β-Naphthalinsulfoglycin zu gewinnen, kann man auf verschiedene Weise vorgehen:

In unseren früheren Versuchen fällten wir aus ziemlich konzentrierter Lösung mit Baryumchlorid. Man saugt den voluminösen Niederschlag gut ab, wäscht ihn mit wenig Wasser,

zerlegt mit Salzsäure und nimmt die freien Naphthalinsulfoaminosäuren sofort in Äther auf. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibt ein zunächst meist amorpher Rückstand.

Dieser Rückstand wird durch siedendes Wasser in zwei Fraktionen, eine relativ leicht und eine sehr schwer lösliche getrennt.

Das die leichter lösliche Fraktion enthaltende Filtrat trübt sich beim Erkalten; der zunächst amorphe Niederschlag kristallisiert erst nach längerem Stehen im Eisschrank.

Er wird des öfteren — unter sehr großen Verlusten — aus heißem Wasser umkristallisiert. Die Kristallisation erfolgt jedesmal rascher, schließlich unmittelbar nach dem Erkalten der Flüssigkeit. Die völlige Befreiung dieser leichter in heißem Wasser löslichen Substanz von der schwerer löslichen ist aber äußerst schwierig. Schließlich wurde eine rein kristallinische, völlig farblose Substanz erhalten, die bei 150° zu sintern anfing und bei 153 bis 154° geschmolzen war (Schmelzpunkt des β-Naphthalinsulfoglycins 156°). Mikroskopisch bestand die Substanz aus beiderseits zugespitzten, zum Teil rosettenartig angeordneten Blättchen. In kaltem Wasser war sie sehr schwer löslich, löste sich aber sofort auf Zusatz von Ammoniak. Die Lösung gab mit Baryumchlorid und Kupfersulfat voluminöse Fällung. Die Ausbeute an dieser reinen Substanz ist wegen des nötigen, häufigen Umkristallisierens eine unbefriedigende. Die Menge der Glykokollfraktion vor dem Umkristallisieren kann aber recht erheblich sein. Sie betrug in dem ersten der beiden oben erwähnten Versuche einer möglichst quantitativen Darstellung für die angewandten 600 ccm Harn 0,40 g, was auf die Tagesmenge berechnet 0,83 g ausmacht. In dem zweiten oben angeführten Versuch war die Menge dieser Fraktion noch weit größer. 0,1703 g einer nur dreimal umkristallisierten mehrere Grade zu niedrig schmelzenden Substanz, die aus mehreren Litern Harn gewonnen war, wurden zur Elementaranalyse verwendet:

Berechnet für $C_{10}H_7SO_2 . NH . CH_2 . COOH$	Gefunden:
C . . . . 54,34 Proz.	54,58 Proz.
H . . . . 4,15 „	4,61 „

Eine zweite Elementaranalyse wurde mit dem öfters umkristallisierten Produkt aus Versuch II vorgenommen. Die Substanz schmolz bei 151°. Zur Elementaranalyse wurden 0,1808 g verwendet.

Berechnet für $C_{10}H_7SO_2 . NH . CH_2 . COOH$	Gefunden:
C . . . . 54,34 Proz.	54,80 Proz.
H . . . . 4,15 „	4,39 „

Wie man sieht, stimmen die gewonnenen Werte ausreichend mit denen des Naphthalinsulfoglycins überein.*)

Ein häufig sehr beträchtlicher Teil der aus der Barytfällung gewonnenen β-Naphthalinsulfoverbindungen bestand aber nicht aus Naphthalinsulfoglycin. Die freie Säure unterschied sich von der Glykokollverbindung, wie bereits erwähnt, durch die erheblich schwerere Löslichkeit in heißem Wasser. Das Barytsalz war in kaltem Wasser weit schwerer löslich als das des β-Naphthalinsulfoglycins.

Dieses Verhalten haben wir in unseren späteren Versuchen mit Vorteil zur Trennung beider Substanzen benützt. Man fällt dann nicht, wie oben beschrieben, aus einer ziemlich konzentrierten, sondern aus einer stark verdünnten Lösung der Ammonsalze mit Baryumchlorid. Das Baryumsalz des β-Naphthalinsulfoglycins geht alsdann in der Hauptmasse ins Filtrat und fällt erst bei stärkerer Einengung des letzteren aus. Allerdings sind auch die so gewonnenen Präparate zunächst stark verunreinigt, doch ist die Ausbeute an reiner Substanz erheblich besser als bei dem oben geschilderten Verfahren.

Die Menge der leicht löslichen Baryumsalze ist gegenüber der schwerer löslichen anscheinend ziemlich geringfügig. Doch geht, auch wenn man aus einer sehr konzentrierten Lösung der Ammonsalze mit Baryumchlorid fällt, stets ein Teil der Substanzen ins Filtrat. Daß es sich nicht etwa nur um der Fällung entgangenes β-Naphthalinsulfoglycin handelt, ergibt sich schon daraus, daß dieses Filtrat die Ebene des polarisierten Lichtes schwach, aber deutlich nach links dreht.

Wie man sieht, gelang es uns bei den soeben geschilderten Trennungsversuchen zwar, einen Teil der mit β-Naphthalinsulfochlorid aus dem normalen Harn erhaltenen Produkte zu identifizieren, die Natur eines anderen, nicht unerheblichen Teils dieser Substanzen blieb aber einstweilen unaufgeklärt.

Ebenso wenig abgeschlossen ist eine Reihe von Spaltungsversuchen, die wir mit den Naphthalinsulfoverbindungen anstellten. Bestand der bei der Trennung nicht identifizierte Anteil der Verbindungen aus β-Naphthalinsulfoaminosäuren, so war zu erhoffen, daß sich nach Spaltung dieser Verbindungen die

*) Wenn es Kionka (Zeitschr. für experimentelle Pathologie und Therapie 2, 23 [1905]) im Gegensatz zu uns nicht gelang, aus normalem Harn β-Naphthalinsulfoglycin zu isolieren, so erklärt sich das wohl daraus, daß dieser Autor nicht die von uns angewandte Modifikation des Fischer-Bergellschen Verfahrens benutzte.

einzelnen Aminosäuren mittelst der Fischerschen Estermethode würden isolieren lassen.

Freilich läßt sich ein Nachteil derartiger Spaltungsversuche gegenüber den geschilderten Trennungsversuchen nicht verkennen.

Bei der notwendigen energischen Behandlung mit konzentrierter Salzsäure würde man eventl. vorhandene Naphthalinsulfoderivate von Peptiden — das Vorhandensein derartiger Substanzen im normalen Harn läßt sich einstweilen keineswegs ausschließen — völlig aufspalten, und statt der Peptide nur die an ihrem Aufbau beteiligten Aminosäuren gewinnen.

Die Spaltung erfolgte nach dem Vorgange von E. Fischer und Bergell durch Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr. Sie ging am besten vor sich, wenn wir etwa 2 bis $2^1/_2$ g Substanz während 5 bis 6 Stunden im Ölbade auf 110 bis 115 Grad erhitzten. Bei Anwendung von größeren Mengen von Substanz wird die Spaltung weit unvollständiger. Beim Erkalten des Rohres kristallisiert ein großer Teil der gebildeten β-Naphthalinsulfosäure aus; daneben finden sich in der braunroten Flüssigkeit größere oder geringere Mengen einer schwarzen Schmiere, die ihren Löslichkeitsverhältnissen nach scheinbar aus Resten ungespaltener Substanz besteht.

Von der ausgeschiedenen β-Naphthalinsulfosäure und der amorphen schwarzen Substanz wird unter Anwendung von Glaswolle abfiltriert, eventl. nachdem die Ausscheidung der β-Naphthalinsulfosäure durch Sättigen mit Salzsäuregas bei niedriger Temperatur vervollständigt wurde. Es bleibt so nur ein äußerst geringer Anteil der β-Naphthalinsulfosäure gelöst.

Das klare Filtrat wird im Vakuum eingeengt, der braune zum Teil kristallinische Rückstand löst sich größtenteils leicht in Wasser. Nach der Filtration wird die wässerige Lösung durch frisch gefälltes Silberoxyd von Salzsäure und von dem reichlich in Lösung gegangenen Silber durch Schwefelwasserstoff befreit. Der nach dem Verjagen des letzteren und nach dem Eindampfen der Flüssigkeit erhaltene Rückstand war größtenteils kristallinisch, die Kristallformen waren jedoch nicht einheitlich. Auch wenig konzentrierte wässerige Lösungen des Rückstandes lösten Kupferkarbonat mit tiefblauer Farbe. Die Lösung gab intensive Millonsche Reaktion. Bei gründlichem Ausäthern der sauren Lösung ging die diese Reaktion veranlassende Substanz nur teilweise in den Äther über.

Das Substanzgemenge verbrannte auf dem Platinblech unter Entwicklung von deutlichem Horngeruch.

Wir haben uns nun, ehe wir die Isolierung der einzelnen Aminosäuren versuchten, zunächst über die Stickstoffverteilung in den bei der Spaltung erhaltenen Flüssigkeiten orientiert. Wir wollen auf diese Versuche nur ganz kurz eingehen. Nach Entfernung der β-Naphthalinsulfosäure in der geschilderten Weise wurde die Hauptmasse der Salzsäure durch Einengung im Vakuum beseitigt. An dem nach Zusatz von Wasser gewonnenen klaren Filtrat wurden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. an einem gemessenen aliquoten Teil eine Bestimmung des Gesamtstickstoffs,

2. an einem zweiten aliquoten Flüssigkeitsquantum der Ammoniakstickstoff durch Destillation mit Magnesia über titrierte Schwefelsäure im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers,

3. in einer dritten gemessenen Portion der Flüssigkeit wurde der durch Phosphorwolframsäure fällbare und der durch dies Reagens nicht fällbare Stickstoff bestimmt.

Wir gehen im einzelnen auf diese Versuche nicht ein, sondern erwähnen nur folgendes:

Die Menge des Ammoniakstickstoffs in den drei angestellten Versuchen schwankte zwischen etwa 8 und 20 Proz. des Gesamtstickstoffs, was wohl den wechselnden Mengen des bei der Schüttelung entstandenen β-Naphthalinsulfamids entsprach.

Die Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs überwog in 2 Fällen ganz erheblich die des Ammoniakstickstoffs (sie war etwa doppelt so groß). Dieses Verhalten dürfte auf das Vorhandensein einer basischen Substanz unter den bei der Salzsäurespaltung erhaltenen Produkten hindeuten. Für das Vorhandensein einer derartigen Substanz gewannen wir eine Reihe weiterer Anhaltspunkte, ohne die Substanz selbst bisher zur Kristallisation zu bringen.

Bei weitem die Hauptmasse des Stickstoffs (62 bis 86 Proz.) war nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar.

Versuche, die einzelnen in dieser „Aminosäurenfraktion" erhaltenen Substanzen zu identifizieren, konnten wir aus äußeren Gründen leider nicht mehr gemeinsam ausführen.

Doch wollen wir schon an dieser Stelle kurz auf eine Versuchsreihe hinweisen, die der eine von uns (Embden) in Gemeinschaft mit Dr. Stern in Angriff genommen hat.

In diesen Versuchen wurden die aus einer größeren Menge von völlig hippursäurefreiem Harn gewonnenen Produkte in der geschilderten Weise durch Salzsäure gespalten. Nach der nunmehr erfolgten Abtrennung ungelöster Substanzreste und möglichst vollständiger Entfernung der β-Naphthalinsulfosäure durch Sättigen mit gasförmiger Salzsäure wurde das zur Sirupdicke eingeengte Substanzgemenge nach dem Verfahren von E. Fischer verestert. Die Veresterung wurde einmal wiederholt. Von der bei der Veresterung ungelöst gebliebenen Substanz, die vorwiegend aus Ammoniumchlorid bestand, wurde abfiltriert. Die schließlich in der üblichen Weise erhaltene ätherische Esterlösung wurde nach dem Verjagen des Äthers der Destillation bei etwa 15 mm Quecksilberdruck unterworfen. Nur die bis zu 56° übergehende Esterfraktion wurde aufgefangen. Sie wurde in der gewöhnlichen Weise durch Sieden mit Wasser verseift, wobei die anfänglich stark alkalische Reaktion vollkommen neutral wurde.

Die aus dieser Fraktion gewonnene Substanz ließ sich leicht nach Überführen in die Kupferverbindung durch die Kupferbestimmung als Glykokoll identifizieren.

Der über 56° siedende Anteil wurde seiner relativ geringen Menge wegen nicht weiter einer fraktionierten Destillation unterzogen, sondern sofort durch mehrstündiges Erhitzen mit Barytwasser auf dem Wasserbade verseift. Nach genauer Entfernung des Baryums durch Schwefelsäure reagierte die Flüssigkeit ganz schwach alkalisch. Die Lösung drehte die Ebene des polarisierten Lichtes ganz schwach nach links und gab eine äußerst intensive Millonsche Reaktion. Die die Millonsche Reaktion bedingende Substanz löste sich auch bei saurer Reaktion nur zum kleinsten Teile in Äther.

Die Flüssigkeit wurde stark eingeengt und nunmehr der spontanen Verdunstung überlassen. Hierbei schieden sich zunächst durchsichtige, homogene, kugelige Gebilde und dunkelgefärbte Kugeln mit radiärer Struktur, sowie Büschel von radiär gestellten Nadeln aus. Bei weiterer Kristallisation kamen daneben noch andere Formen zum Vorschein. In dem Gesamtverhalten der aus der höher siedenden Esterfraktion gewonnenen Aminosäuren liegt ein Hinweis darauf, daß sich unter ihnen Leucin und namentlich Tyrosin vorfanden.

Endgültig kann der Beweis natürlich nur durch die Elementaranalyse der isolierten Substanzen erbracht werden.

Es ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen, daß sich aus dem normalen Harn reichlich Reaktionsprodukte mit β-Naphthalinsulfochlorid gewinnen lassen, wofern nur der Harn bei der Ausführung der Reaktion genügend alkalisch gehalten wird.

Den erhaltenen Produkten ist — mehr oder weniger reichlich — das Amid der β-Naphthalinsulfosäure*) beigemengt, doch läßt sich dieses sehr leicht abtrennen.

Die bei diesem Trennungsprozeß gewonnene Lösung der Ammonsalze der verschiedenen Reaktionsprodukte gibt mit Baryumchlorid eine sehr voluminöse Fällung. Der Niederschlag besteht zum Teil aus dem Barytsalz des Naphthalinsulfoglycins, zum Teil aus mindestens einem anderen, in Wasser weit schwerer löslichen Barytsalz, dessen Natur einstweilen nicht aufgeklärt ist.

Ein Teil der Reaktionsprodukte ist optisch aktiv; eine alkoholische Lösung des Gemenges dreht nach links.

Die Gewinnung relativ reichlicher Mengen von Naphthalinsulfoglycin gelingt auch dann, wenn der frische Harn vollständig von Hippursäure befreit wurde. Trotzdem läßt sich die Möglichkeit

*) Daß dieses bei starker alkalischer Reaktion ziemlich reichlich auftretende β-Naphthalinsulfoamid, wie Abderhalden und Schittenhelm [Zeitschr. f. physiol. Chemie **45**, 470 (1905), Fußnote] fürchten, jemals zu „unangenehmen Täuschungen" Veranlassung geben kann, können wir bei der Leichtigkeit, mit der sich diese Substanz beseitigen läßt, kaum annehmen.

nicht mit Sicherheit ausschließen, daß das Glykokoll im Harn ursprünglich nicht in freier, sondern in Form irgendwelcher gepaarter Verbindungen vorhanden ist.

Es wäre immerhin nicht ausgeschlossen, daß bei der von uns angewandten Alkaleszenz derartige gepaarte Verbindungen des Glykokolls und anderer Aminosäuren gespalten und so die Aminosäuren der Reaktion mit Naphthalinsulfochlorid zugänglich gemacht würden.*)

Freilich ergaben uns Versuche, in denen wir geringe Mengen einer Aminosäure (i-Alanin) dem Harn hinzufügten und dann die Behandlung des letzteren mit β-Naphthalinsulfochlorid bei verschiedener Alkaleszenz vornahmen, daß die Bildung von β-Naphthalinsulfoalanin gerade so wie beim nicht mit Aminosäure versetzten Harn erst bei stärkerem Alkalizusatz eintrat.

Die Frage, ob das von uns im Harne aufgefundene Glykokoll von vornherein in freier oder gebundener Form vorhanden war, bleibt sonach einstweilen offen.

Das Auftreten von Glykokoll im Harn erscheint zwar insofern auffällig, als gerade diese Aminosäure als ganz besonders gut assimilierbar gelten muß [Stolte**)].

Anderseits aber wissen wir, daß der Organismus dauernd erhebliche Mengen Glykokoll produziert (Glykocholsäure und Hippursäure), und vielleicht ist es nur besonders reichliche Produktion des Glykokolls im intermediären Stoffwechsel, die einen Teil dieser Substanz in den Harn übertreten läßt.

Nach der Hydrolyse der Reaktionsprodukte durch Salzsäure ließen sich neben dem Glykokoll auch andere, zum Teil wenigstens optisch aktive Aminosäuren nachweisen. Diese Aminosäuren wurden bisher nicht mit Sicherheit identifiziert, wenn auch das Auftreten von Leucin und namentlich von Tyrosin einigermaßen wahrscheinlich gemacht wurde.

Ob die erst bei der Hydrolyse nachgewiesenen Aminosäuren im Harn präformiert waren, oder ob sie bei der Salzsäurespaltung aus höher molekularen Substanzen — etwa peptidartiger Natur — gebildet wurden, darüber gibt die vorliegende Arbeit keinen Aufschluß.

*) Synthetisch gewonnene r-Alaninuraminosäure lieferte uns bei der Behandlung mit β-Naphthalinsulfochlorid in der Tat ein Produkt, das nach Schmelzpunkt und Stickstoffgehalt mit dem Naphthalinsulfoalanin identisch war.

) Stolte, K., Über das Schicksal der Monaminosäuren im Tierkörper nach Einführung in die Blutbahn. Diese Beiträge **5, 15 (1903).

XXII.

Über das Verhalten in den Tierkörper eingeführter Aminosäuren.*)

Von Dr. **Max Plaut** und Dr. **Heinrich Reese**.

Aus dem städtischen Krankenhause zu Frankfurt a. M. Oberarzt Prof. Dr. v. Noorden.

In der voranstehenden Arbeit wurde gezeigt, daß sich aus normalem menschlichen Harn mittelst einer von Fischer und Bergell angegebenen Methode Produkte gewinnen lassen, die wenigstens zu einem erheblichen Teil aus Naphthalinsulfoaminosäuren bestehen. Insbesondere wurde aus dem erhaltenen Reaktionsgemenge Naphthalinsulfoglycin isoliert. Wenn es also den Anschein gewann, daß schon beim normalen Eiweißabbau ein — wenn auch geringer — Teil der intermediär auftretenden Aminosäuren durch den Harn ausgeschieden wird, so lag darin die Aufforderung, auch in größerer oder geringerer Menge dem Organismus einverleibte Aminosäuren im Harn aufzusuchen.

Seitdem Schultzen und Nencki**) zeigten, daß verfütterte Aminosäuren vor allem zu einer Vermehrung von Harnstoff führten, ist das Schicksal in den Tierkörper eingebrachter Aminosäuren öfters untersucht worden. Nur in einzelnen Fällen hat man nach Verabreichung großer Mengen von Aminosäuren geringe Anteile derselben im Harn auftreten sehen. So konnte Salkowski***) nach Verfütterung von 25 g Glykokoll beim Hund

*) Die wesentlichen, dieser Arbeit zugrunde liegenden Tatsachen wurden auf Grund sämtlicher, hier veröffentlichter Versuche an Hunden und Menschen bereits auf dem diesjährigen Kongreß für innere Medizin zu Wiesbaden durch G. Embden vorgetragen. Diesen im April publizierten Resultaten sehr ähnliche wurden durch J. Wohlgemuth in den Berichten d. deutsch. chem. Gesellschaft vom 17. Juni veröffentlicht. (Eingegangen am 20. Mai 1905.)

**) Schultzen und Nencki, Zeitschr. f. Biologie 8.

***) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 4, 54 u. 100 (1880).

einen Teil derselben im Harn wieder auffinden. Für das Taurin und das Sarkosin gelang ihm*) der Nachweis, daß diese Substanzen zum Teil mit dem Karbaminsäurerest gepaart den Tierkörper als Uraminosäuren verlassen. Bezüglich des Tyrosins konnte Blendermann**) ein ähnliches Verhalten feststellen, indem er zeigte, daß beim Kaninchen nach Verfütterung von Tyrosin sich aus dem Harn Tyrosinhydantoin gewinnen ließ. Salaskin und Kowalewsky***) fanden nach intravenöser Injektion von großen Dosen Glykokoll am mit Morphium vergifteten Hund reichliche Mengen Glycin im Urin wieder. Diese Untersuchungen, bei denen sich nach Einführung von Aminosäuren dieselben — teils in freier, teils in gebundener Form — im Harn wieder nachweisen ließen, sind mit relativ großen Mengen angestellt worden. Bei Verabreichung kleinerer Dosen gelang die Auffindung von Aminosäuren unter den Endprodukten des Stoffwechsels nicht. So konnten Abderhalden und Bergell†) nach wiederholter Einnahme von Glykokoll (bis 5 g), i-Alanin (3 g), Leucin (8 g), Phenylalanin (3 g) mittelst der Naphthalinsulfochloridmethode keine Aminosäuren nachweisen. Bei Kaninchen, denen 2 bzw. 3 g Glykokoll subkutan injiziert wurden, ließen sich nur Spuren dieser Substanz als Naphthalinsulfoglycin wieder gewinnen.

Auch A. Loewy und Neuberg††) stellten fest, daß per os eingeführte Aminosäuren wie Tyrosin, Leucin, Asparaginsäure und Cystin als solche spurlos verschwinden, wenigstens wenn man sie einem normalen Organismus einverleibt. Einer mehr indirekten Methode bediente sich Stolte†††); er konnte bei Bestimmung der einzelnen Stickstofffraktionen im Harn nach Pfaundler namentlich für die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, aber auch für Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure eine deutliche Veränderung der Monaminosäurefraktion feststellen, während Glykokoll und anscheinend auch Leucin nur nach Injektion sehr großer Mengen zu einer überdies rasch vorübergehenden Ausscheidung von Aminosäurenstickstoff führten.

Besondere Beziehungen zwischen dem Ernährungszustand der Versuchstiere und dem Verhalten gegenüber eingeführten Amino-

---

*) E. Salkowski, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **6**, 744, 1191. — Zeitschr. f. physiol. Chemie **4**, 400.

) Blendermann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **6, 324.

***) Salaskin und Kowalewsky, Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 412.

†) Abderhalden und Bergell, Zeitschr. f. physiol. Chemie **39**, 10 (1903).

††) A. Loewy und Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 342.

†††) Stolte, Diese Beiträge **5**, 15.

säuren beschrieb Rahel Hirsch*). Es gelang ihr nach subkutaner Injektion von 15 g r-Alanin bei einem Hund am 8. Hungertag aus dem Harn eine nicht unerhebliche Menge Naphthalinsulfoalanin zu gewinnen; auch bei einem Phlorizinhungertier ließ sich am 17. Tag des Hungerns nach Verabreichung von 10 g i-Alanin per os aus dem Harn β-Naphthalinsulfoalanin isolieren. In einem anderen Versuch konnte jedoch bei einem Hungerhund per os zugeführtes Alanin nicht aus dem Harn wiedergewonnen werden, und bei gefütterten Hunden trat weder nach subkutaner Injektion noch nach Verabreichung größerer Mengen per os Alanin im Urin auf. Ebensowenig gelang es, bei einem Phlorizinhungerhund injiziertes Glykokoll im Harn wieder aufzufinden.

Unsere eigenen Untersuchungen erstrecken sich zunächst ausschließlich auf das r-Alanin. Sie wurden zum Teil an Hunden ausgeführt, zum Teil an gesunden Menschen. Genau wie in der voraufgehenden Arbeit fällten wir die zur Untersuchung kommenden Harne mit Bleizucker, befreiten von überschüssigem Blei durch Schwefelwasserstoff und von diesem durch einen Luftstrom. Die zur Entfernung von Hippursäure folgende Ausätherung fand bei sauerer Reaktion statt, teils durch wiederholtes Schütteln mit größeren Quantitäten Äther, teils im Extraktionsapparat. Gleich hier wollen wir bemerken, daß es uns in sämtlichen Versuchen an Menschen und Hunden gelang, einen Teil des eingeführten Alanins im Harn wieder aufzufinden, mochten unsere Versuchstiere im Hungerzustand und mochte die Alaninmenge größer oder geringer sein.

Nach den Erfahrungen, die Embden und der eine von uns am normalen Harn gemacht hatten**), lenkten wir naturgemäß unser Augenmerk ganz besonders auf den Grad der Alkaleszenz bei der Behandlung mit β-Naphthalinsulfochlorid. Wir fanden die in der voranstehenden Arbeit am normalen Harn festgestellten Verhältnisse für den Harn nach Alaninverabreichung in vollem Umfang bestätigt. Wenn wir die Reaktion schwach alkalisch hielten, sahen wir auch bei längerem Schütteln keine oder nur geringe Spuren von Reaktionsprodukten auftreten; bei stärkerer Alkaleszenz erhielten wir dagegen stets reichliche Niederschläge.

Die Schüttelung der alkalisch gemachten Harne erfolgte in einem ziemlich kalten Raum (Temperatur etwa 7 bis 11°). Hierbei verlief, ebenso wie bei den Versuchen am normalen Harn, die Reaktion recht langsam,

---

*) Rahel Hirsch, Zeitschr. f. exper. Path. u. Pharm. **1**, 143 (1905).
) Embden und Reese, Diese Beiträge **7, 411.

und wir konnten die Beobachtung machen, daß die bei der ersten Ausschüttelung gewonnenen Produkte relativ reich an den auch aus normalem Harn gewinnbaren Substanzen waren, während bei öfterer Wiederholung der Reaktion das Naphthalinsulfoalanin von vornherein nahezu rein gewonnen wurde. Jedenfalls gelang es durch mehrmaliges Umkristallisieren die Alaninverbindung in genügend reinem Zustand zu isolieren, wovon wir uns in einer Anzahl von Fällen durch Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen überzeugen konnten. Die Elementaranalyse in jedem Einzelfall auszuführen, erschien uns unnötig, weil die umkristallisierten Produkte durch ihre Löslichkeitsverhältnisse, ihre Kristallform und namentlich durch ihr optisches Verhalten (siehe unten!) genügend charakterisiert erschienen. Der Schmelzpunkt der erhaltenen Substanzen konnte uns hingegen nicht als Anhaltspunkt für ihre Reinheit dienen, er war bei den verschiedenen Präparaten nicht konstant, was wohl dadurch bedingt war, daß es sich bei den gewonnenen Alaninverbindungen um ein Gemenge rechtsdrehender und inaktiver Substanz handelte.

Einen wichtigen Fingerzeig bei unseren Untersuchungen lieferte uns die polarimetrische Untersuchung der alkoholischen Lösungen unserer Reaktionsprodukte; dabei erwiesen sich die Verbindungen des normalen Harns, wie in der voranstehenden Arbeit erwähnt wurde, als nahezu inaktiv oder schwach links drehend, während die nach Verabreichung von r-Alanin erhaltenen Produkte stark rechts drehten.*) Schon Rahel Hirsch hat darauf aufmerksam gemacht, daß das nach Zuführung von r-Alanin aus dem Harn gewinnbare Naphthalinsulfoalanin nicht mit der Verbindung des r-Alanin identisch ist.

Bei Vorhandensein größerer Alaninmengen dauerte es trotz häufigen Zusatzes von Alkali und Naphthalinsulfochlorid unter den angegebenen Temperaturverhältnissen oft tagelang, bis die Reaktion erschöpft war.

Wir geben nunmehr unsere Versuchsresultate in tabellarischer Anordnung wieder. (Siehe Tabelle I auf S. 429.)

Wie man sieht, ist die Menge der aus dem Harn gewonnenen Verbindung eine außerordentlich schwankende. Wir wollen aber darauf aufmerksam machen, daß die Naphthalinsulfochloridmethode auch in der hier angewandten Modifikation keineswegs als quantitativ zu betrachten ist. Zudem wurden die ersten beiden Versuche, die eine auffällig geringe Menge von β-Naphthalinsulfoalanin ergaben, bei ungenügender Alkaleszenz ausgeführt. Den größten überhaupt gefundenen Wert (abgesehen von dem noch zu

*) Nach einer Diskussionsbemerkung des Herrn P. Bergell zu dem oben erwähnten Vortrage von Embden auf dem Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden handelt es sich bei dem rechtsdrehenden Naphthalinsulfoalanin nicht, wie wir geglaubt hatten, um die Verbindung des d-Alanin, sondern um jene des l-Alanin.

Tabelle I.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
	Gewicht des Hundes	Ernährungszustand	Verabreichte Menge Alanin in g	Art der Verabreichung	Harnmenge der nächsten 24 Stunden	Gewonnenes Rohprodukt in g	Bemerkungen
1	2270	Hungert seit 5 Tagen	11,4	per os	103 ccm	0,358	
2	2870	Hungert seit 7 Tagen	9,4	per os	64 ccm	0,264	75 Min. nach Alaninverabreichung Erbrechen. Käfig gewechselt, kein Erbrechen mehr.
3	3050	Reichlich gefüttert	15,0	per os	230 ccm	1,22	
4	3230	Reichlich gefüttert	15,0	per os	780 ccm	1,54	
5	etwa 3100	Reichlich gefüttert	15,0	per os	690 ccm	1,92	
6	3620	Reichlich gefüttert	15,0	per os	650 ccm	1,8	
7	9000	Hungert seit 5 Tagen	15,0	per os	130 ccm	1,88	Nur 65 ccm Harn verarbeitet und hieraus 0,94 g Substanz gewonnen.
8	etwa 9000	Hungert seit 7 Tagen	15,0	subkutan	130 ccm	2,81	
9	3420	Reichlich gefüttert	15,0	per os	715 ccm	2,83	
10	4450	Reichlich gefüttert	10,0	subkutan	270 ccm	2,16	Geringe Urinmenge durch diarrhoischen Stuhl verunreinigt, deshalb nicht berücksichtigt.
11	3820	Reichlich gefüttert	5,0	subkutan	260 ccm	1,66	Mehrfach umkristallisiert. Schmelzp. 122 bis 123°. Elementaranalyse siehe Text.
12	—	Pankreasloser Hungerhund	50,0	Teils per os, teils subkutan	1060 ccm	[5,07]	Elementaranalyse siehe Text.

besprechenden Versuch 12) sehen wir in Versuch 9, wo bei einem reichlich gefütterten Hund nach Verabreichung von 15 g r-Alanin per os 2,83 g Substanz wiedergefunden wurden. Derselbe Hund schied in einem späteren Versuch, der ebenfalls am reichlich gefütterten Tier vorgenommen wurde, nach Verabreichung von 5 g r-Alanin 1,66 g Naphthalinsulfoalanin aus. Die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs ergab in diesem Fall genügend übereinstimmende Werte:

0,1832 g Substanz lieferten 0,3769 g CO_2 und 0,0801 H_2O.

	Gefunden:	Berechnet:
C	56,11 Proz.	55,91 Proz.
H	4,86 „	4,66 „

In einem anderen Fall wurde einem pankreasdiabetischen Hund im Verlauf von 4 Tagen 50 g r-Alanin teils per os teils subkutan appliziert, der Harn — soweit er nicht zu anderen Untersuchungen gebraucht wurde — gesammelt und 5,07 g der Verbindung dargestellt.

Es muß aber bezüglich dieses Versuchs darauf hingewiesen werden, daß ein Teil des gefundenen Alanins möglicherweise durch Erbrechen in den Harn gelangt war, obgleich der Hund nach Verabreichung des Alanins stundenlang beaufsichtigt wurde. Daß es sich nicht ausschließlich um erbrochenes Alanin handelt, folgt daraus, daß die gewonnene Substanz stark rechts drehte.*) Auch mit diesem Produkt wurde die Elementaranalyse vorgenommen:

0,1832 g Substanz lieferten 0,3741 g CO_2 und 0,0795 g H_2O.

	Gefunden:	Berechnet:
C	55,69 Proz.	55,91 Proz.
H	4,82 „	4,66 „

Aus sämtlichen Hundeversuchen geht jedenfalls hervor, daß — wie bereits erwähnt — in allen Fällen verabreichtes -Alanin im Harn wieder auftrat. Eine Beziehung zwischen dem Ernährungszustand der Hunde und der Ausscheidungsgröße etwa in der von Rahel Hirsch angenommenen Weise läßt sich aus unseren Versuchen nicht erkennen. (Siehe Tabelle II auf S. 431.)

Außer den Versuchen an Hunden haben wir auch einige Versuche an völlig gesunden Menschen vorgenommen. Es zeigte sich, daß nach Verabreichung relativ kleiner Mengen r-Alanin ein nicht unerheblicher Teil der genommenen Substanz in den Harn übergeht. Nach Einnahme von 50 g konnten wir bei der Versuchsperson I etwa 18,1 g Verbindung aus dem Harn gewinnen. Es muß aber bemerkt werden, daß dieses Resultat als Minimalzahl aufzufassen ist; denn der Verlauf der Reaktion mit β-Naphthalinsulfochlorid war trotz genügender Alkalimengen ein so außer-

*) Almagia und Embden, Diese Beiträge 7, 305.

ordentlich träger, daß wir uns damit begnügten, die Ausschüttelung mit dem Reagens 5 bis 7 mal je 1 bis 2 Tage lang vorzunehmen. Bei höheren Außentemperaturen (25 bis 30°) gelingt die Gewinnung des ausgeschiedenen Alanins sehr viel rascher, wenigstens wenn die Schüttelung des Harns mit dem β-Naphthalinsulfochlorid in der auf Seite 415 dieses Bandes geschilderten Weise geschieht.

Tabelle II (Versuche an Menschen).

Nr.	Gewicht kg	Verabreichte Menge Alanin in g	Harnmenge der nächsten	in ccm	Gewonnenes Rohprodukt in g	Bemerkungen
I	75	50,0	24 Stunden	1370	18,1	Sintert zw. 119 bis 120° Schmelzpkt. 122 bis 123°
II	65	11,0	$6^1/_2$ Stunden	360	5,2	Elementaranalyse siehe Text
III	70	6,0	6 Stunden	—	0,84	

Die Menge der Reaktionsprodukte war zwar bei den letzten Schüttelungen eine relativ geringe, aber die Reaktion noch nicht zum völligen Abschluß gelangt. Zudem wurde in den beiden letzten Versuchen nur der Harn der ersten 6 Stunden auf Alanin verarbeitet, da voraussichtlich der Nachweis der Verbindungen am leichtesten in den ersten nach der Einnahme entleerten Harnportionen gelingen mußte. Ebenso wie die aus dem Harn der Hunde gewonnenen Verbindungen, drehten die erhaltenen Produkte des menschlichen Urins stark nach rechts.

Mit den genügend umkristallisierten Produkten aus dem Harn von Versuch II wurde die Elementaranalyse ausgeführt.

0,2033 g Substanz lieferten 0,4163 g CO_2 und 0,0889 g H_2O.

	Gefunden:	Berechnet:
C	55,85 Proz.	55,91 Proz.
H	4,86 „	4,66 „

Das Präparat sinterte bei 108° und schmolz zwischen 110 und 111°.

Bei Versuch III wurde ein Präparat erhalten, das in charakteristischer Weise kristallisierte und stark nach rechts drehte. Es war aber immerhin erheblich verunreinigt, und wir haben in diesem Fall von einer völligen Reindarstellung des Produktes abgesehen. Trotzdem berechtigen uns die Kristallform

und das optische Verhalten mit Sicherheit zu behaupten, daß nach Einnahme von 6 g r-Alanin eine nicht unerhebliche Menge dieser Substanz ausgeschieden wurde. Nicht in die Tabelle aufgenommen haben wir einen Versuch, in dem auch nach Verabreichung von 4 g Alanin eine Substanz mit der charakteristischen Kristallform gewonnen wurden, deren alkoholische Lösung nach rechts drehte.

Nach Einnahme von 11 g Alanin wurden in Versuch II über 5 g Substanz aus dem Harn der ersten 6 Stunden gewonnen. Der Urin der nächsten 18 Stunden enthielt auch noch merkliche Mengen. Jedenfalls geht aus diesem Versuch hervor, daß die nach Verabreichung von 11 g r-Alanin an einen Menschen von 65 kg Gewicht ausgeschiedene Menge sehr viel größer ist als die nach Fütterung von 15 g an einen Hund von einigen kg im Harn auftretende — ein Verhalten, das immerhin bemerkenswert erscheint.

Zum Schluß sei es uns vergönnt, Herrn Dr. Embden für die Anregung zu dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung bei ihrer Anfertigung unseren verbindlichsten Dank auszusprechen.

XXIII.

Über das Verhalten der Toluidine im tierischen Organismus.

Von Dr. med. **Herm. Hildebrandt,**
Privatdozenten und Assistenten des Instituts.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.

Vor einigen Jahren habe ich*) nachgewiesen, daß die mit Chlor und Brom substituierten Toluole im Organismus infolge der Oxydation des Methyls zu Karboxyl in die entsprechenden halogensubstituierten Benzoesäuren übergehen, welche beim Hunde stets als Hippursäuren im Harn erscheinen, während dies beim Kaninchen nur im Falle der bromsubstituierten Toluole der Fall ist. Wie ich ferner fand, gehen die drei Amidobenzoesäuren wenigstens zum Teil unverändert in den Harn über. Gleichwohl konnte ich für die Toluidine $C_6H_4 <{CH_3 \atop NH_2}$ ebensowenig wie Graebe und Schultzen**) den Nachweis liefern, daß auch hier eine Oxydation von CH_3 zu COOH erfolgt.

Nun hat bereits A. W. Hofmann***) bei Gelegenheit seiner Untersuchungen über das Verhalten der Monamine zu Oxydationsmitteln festgestellt, daß während bei Anilin und Toluidin durch Kaliumpermanganat der Wasserstoff der Amidgruppe oxydiert wird, die acetylierten Derivate des Xylidins und p-Toluidins eine Oxydation der CH_3-Gruppe zu Karboxyl erfahren. Die Acetylgruppe erhöht also die Stabilität dieser Verbindungen auch unter dem Einflusse oxydierender Agentien. Eine der von Hofmann gewonnenen Acet-p-amidobenzoesäure isomere o-Verbindung wurde von Bedson und King†) durch Oxydation des Acet-o-Toluidins dargestellt.

---

*) Diese Beiträge **3**, 365 ff (1902).
**) Du Bois-Reymonds Arch. 169 (1867).
***) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **9**, 1299 (1876).
†) Chem. soc. 742 (1880).

Diese Erfahrungen veranlaßten mich bereits vor längerer Zeit, die Untersuchung mit dem im Handel zugänglichen Dimethyltoluidin wieder aufzunehmen. Wegen der weniger starken Giftigkeit wählte ich die p-Verbindung.

Die Flüssigkeit wurde, mit der gleichen Menge Olivenöl gemischt, den Versuchstieren mittels Schlundsonde eingegeben. Auch wenn nur 1 g pro die gegeben wurde, gingen die Tiere gewöhnlich in einigen Tagen ein und zeigten im Magendarmkanale zirkumskripte bzw. diffuse Blutungen. Ich habe schließlich das Gift den Tieren nur jeden zweiten Tag beigebracht. Der Harn der Tiere wurde wie bei meiner früheren Untersuchung mit Ammoniak kurze Zeit gekocht, kalt filtriert und das phosphorsauer gemachte Filtrat ausgeäthert.

Aus dem Ätherrückstande des Harns habe ich nach Behandeln mit Tierkohle und Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol die p-Dimethylamidobenzoesäure Sp. 235° isoliert; sie ist zum Unterschied von der p-Aminobenzoesäure in kalter Essigsäure unlöslich, in viel heißer Essigsäure aber löslich und fällt beim Erkalten wieder aus.

Wenn ich den nicht alkalisch erwärmten Harn direkt nach dem Ansäuern mit Äther extrahierte, konnte ich nur ganz geringe Mengen der p-Dimethylamidobenzoesäure gewinnen. Es zeigte dies, daß im wesentlichen erst durch das Erwärmen die Säure entstanden war. Da ich nun feststellte, daß nach Zufuhr von Dimethyl-p-Toluidin der Harn reduzierende Eigenschaften zeigte, war es höchst wahrscheinlich, daß eine gepaarte Glykuronsäure vorlag, die mit den bisher bekannten verglichen allerdings nur in der Urochloralsäure*) ein Analogon zu finden schien, da die andern gepaarten Glykuronsäuren sich lediglich durch Mineralsäuren spalten lassen. Ich stellte ferner fest, daß die gepaarte Verbindung durch das Bleiverfahren isoliert werden kann; sie geht in den mit Bleiessig erzeugten Niederschlag über und kann daraus durch das Verfahren isoliert werden, welches sich mir bereits bei der Darstellung der nach Eingabe von Citral**) entstehenden zweibasischen Säure bewährt hatte.

Soweit waren meine Untersuchungen vorgeschritten, als die Abhandlung von M. Jaffé***) „über das Verhalten des p-Dimethylaminobenzaldehyds im tierischen Stoffwechsel" erschien. Es unterliegt keinem Zweifel, daß es sich in beiden Fällen um dasselbe Produkt handelt und daß auch die weiteren von Jaffé aufgefundenen Stoffwechselprodukte bei Einfuhr des Dimethyl-p-Toluidins

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **6**, 480ff. (1882).

) Archiv f. experim. Pharmakologie u. Pathologie **46, 261 (1901).

***) Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 374 (1905).

ebenfalls auftreten, besonders auch die Monomethyl-p-Amidobenzoesäure. Am leichtesten gewinnt man übrigens die mit Glykuronsäure verbundene Verbindung, wenn man nicht den Dimethylamidobenzaldehyd, sondern die wesentlich weniger differente p-Dimethylamidobenzoesäure in Lösung den Tieren eingibt.

Für deren Darstellung haben unlängst R. Willstätter und W. Kahn*) folgende Vorschrift gegeben: p-Aminobenzoesäure wird in methylalkoholischer Lösung mit Jodmethyl (2 Mol.) und mit konzentrierter Natronlauge (2 NaOH) versetzt; bei mehrtägigem Stehen in der Kälte scheidet sich die dimethylierte Säure aus.

Ich habe mit der p-Dimethylamidobenzoesäure im Anschluß an meine früheren Versuche über die isomeren Amidobenzoesäuren einige Versuche angestellt und zum Vergleich auch die p-Trimethylaminobenzoesäure (p-Benzbetaïn) nach dem Verfahren von R. Willstätter und W. Kahn**) dargestellt.

Man setzt zur Lösung von p-Aminobenzoesäure mit einem Überschuß von Jodmethyl und Ätzkali in Methylalkohol Jodwasserstoffsäure bis zur sauren Reaktion, filtriert von der ausfallenden Dimethylamidobenzoesäure ab und fällt mit Jod das Perjodid der Trimethylamidobenzoesäure, welches beim Behandeln mit Wasserdampf zerfällt und das Benz-Betaïnjodhydrat liefert (Schmelzp. 255°). Dieses lagert sich, wie die genannten Autoren fanden, analog dem von P. Grieß***) festgestellten Verhalten der m-Trimethylaminobenzoesäure, beim Schmelzen in den isomeren Ester um;

I. $-N(CH_3)_3$ — $C{\cdot}O$, $C{=}O$ $\longrightarrow$ II. $N(CH_3)_2$ — $COOCH_3$

hierbei verliert die Substanz die Eigenschaft einer Ammoniumbase, als welche I jedenfalls aufzufassen ist, da 4 Valenzen des N an C gebunden sind.

Gelegentlich meiner Untersuchungen über die Amidobenzoesäuren†), die ich an weißen Mäusen anstellte, habe ich festgestellt, daß die o-Verbindung schon zu 0,05 g heftige Krampferscheinungen erzeugt, während die gleiche Dosis bei der m- und p-Verbindung noch ohne Wirkung ist. Neuerdings stellte ich fest, daß in neutralen Lösungen der o-Amidobenzoesäure (Mol. 137) von 1,37 : 200 Kaulquappen in etwa 24 Stunden absterben; im Falle der m- und p-Verbindung erfolgte das Absterben erst

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **37**, 411 (1904).

**) loc. cit. S. 415.

***) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **4**, 585 (1873).

†) loc. cit. S. 371.

nach zwei weiteren Tagen, als durch Verdunstung die Konzentration schon erheblich größer geworden war.

In entsprechenden Lösungen der Dimethyl-p-Amidobenzoesäure (Mol. 165) starben Kaulquappen in wenigen Minuten ab; selbst in der doppelten Verdünnung (1,65 : 400) starben sie in etwa 5 Stunden. Der Ersatz der beiden Wasserstoffe der Amidogruppe durch Methyl macht diese also zu einer wesentlich differenteren Verbindung.

Eine noch geringere Giftigkeit habe ich bei den den Amidobenzoesäuren entsprechenden Sulfanilsäuren beobachtet: $H_2N\langle\;\rangle SO_3Na$.

Weiße Ratten vertrugen die subkutane Injektion von 0,25 g der Sulfanilsäuren sowie 0,35 g der Diacetderivate*) ohne schädliche Wirkung.

Lösungen der Sulfanilsäuren und ihrer Diacetderivate (Mol. 196 bzw. 280) von 1,96 bzw. 2,8 : 200 ließen nur im Falle der o-Diacetverbindung eine schädliche Wirkung auf Kaulquappen erkennen, indem nach etwa 24 Stunden Absterben erfolgte. Also auch in der Reihe der Sulfanilsäuren gilt das Gesetz, daß die o-Verbindung die differenteste ist, wie aus dem Verhalten ihres Diacetderivates hervorgeht; und es zeigt sich gleichzeitig, daß die Einführung der Acetylreste in die Amidogruppe eine Verstärkung der Wirkung zur Folge hat, ebenso wie im Falle der Amidobenzoesäure die Einführung von Methyl.

Noch differenter als die Dimethyl-p-Amidobenzoesäure ist das Trimethylderivat; ich verwendete zunächst das jodwasserstoffsaure Salz, welches in Wasser leicht löslich ist (Mol. 307); in Lösungen von 3,0 : 400 trat in wenigen Minuten ein Absterben ein; ebenso wirkten entsprechende Lösungen des freien Benzbetaïn (Mol. 161), während Lösungen des isomeren Esters (cf. oben „II.") ähnlich der Dimethylamidobenzoesäure wirkten.

Bemerkenswert erscheint mir die Wirkung des Benzbetaïns am Frosche; als Ammoniumbase konnte sie eine kurareartige Wirkung äußern; eine solche trat nicht ein; dagegen machte sich nach Injektion von 0,1 g des Jodhydrates bzw. 0,05 g des freien Benzbetaïns in den Kehllymphsack von Fröschen (Eskulente) binnen einigen Stunden eine auffällige Steifheit der hinteren Extremitäten bemerkbar, die der durch Injektion von Coffein zu erzeugenden glich. Der Herzschlag war zu dieser Zeit bereits

*) Ich verdanke diese zum Teil noch nicht bekannten Substanzen Herrn Prof. Schröter in Bonn.

verlangsamt; die Muskeln waren von weißer Farbe und reagierten auch auf starke Ströme nicht mehr. Um diese Wirkung hervorzurufen, sind erheblich größere Dosen erforderlich als von den Substanzen, welche nach den bisherigen Erfahrungen eine solche Eigenschaft haben, wie die Xanthine und die neuerdings von E. Jacoby, Hayashi und Szubinski*) untersuchten zyklischen Isoxime und Oxime. Die Konzentration der Lösung muß eine stärkere sein, um die Froschmuskelfaser unter dem Mikroskop zur Gerinnung zu bringen. Da nach meinen Versuchen weder der Dimethylamidobenzoesäure noch ihrem Methylester die Muskelwirkung zukommt, so dürfte für ihr Zustandekommen die Lagerung der CO·N-Gruppe die Ursache sein, analog wie bei den Xanthinbasen und den zyklischen Isoximen, wenn auch die Fünfwertigkeit des N im Falle des Benzbetaïns zweifellos nicht ohne Einfluß sein dürfte.

Aus dem Mitgeteilten geht hervor, daß mit der Einführung von Methylgruppen in die Amidogruppe der p-Amidobenzoesäure die Giftigkeit erheblich zunimmt; ein Gleiches scheint bei den Toluidinen der Fall zu sein, insofern ich beobachtete, daß das Dimethyl-p-Toluidin noch differenter ist als das p-Toluidin selbst.

---

*) Archiv f. experim. Pharmakologie u. Pathologie **50**, 240 (1903).

XXIV.

Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glykuronsäuren.

Von Dr. med. **Hermann Hildebrandt.**

Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.

Gelegentlich der Untersuchung der von mir nach Darreichung von Thymotin-Piperidid erhaltenen gepaarten Glykuronsäure*) machte ich die Beobachtung, daß gewisse Fermente, nämlich Emulsin, Kefirlaktase und Myrosin, die Eigenschaft haben, diese Verbindung zu spalten, wenn man die Fermente bei Bruttemperatur und schwach essigsaurer Reaktion einwirken läßt. Nach dem Filtrieren der Mischung wurde alkalisch gemacht und das Spaltungsprodukt mittels Äther der Flüssigkeit entzogen. Die Spaltung war immer nur eine partielle, ebenso wie in den Versuchen von C. Neuberg und W. Neimann**), welche fanden, daß die Euxanthinsäure durch Emulsin und Kefirlaktase eine Spaltung erfährt. Spricht dieses Verhalten schon für die Richtigkeit der von E. Fischer und Piloty***) ausgesprochenen Anschauung, daß die gepaarten Glykuronsäuren nach dem Typus der Glykoside gebaut sind, so wurde diese Auffassung zur Gewißheit durch die von C. Neuberg und W. Neimann ausgeführte Synthese einiger gepaarter Glykuronsäuren.

Bei den Versuchen mit Myrosin bediente ich mich eines vor mehr als 15 Jahren von mir dargestellten Trockenpräparates†), das nach so langer Zeit noch intensiv das myronsaure Kali zerlegte. Seine Wirkung auf die gepaarte Glykuronsäure war keine sehr starke, aber deutlich nachweisbar. Andere Fermente, Invertin, Malz-, Taka-Diastase, Pepsin zeigten keine spaltende Wirkung und sind auch Glykosiden gegenüber unwirksam.

Hinsichtlich der Urochloralsäure haben bereits E. Fischer und Piloty darauf hingewiesen, daß auf sie ihre Anschauung

---

*) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. **44** (1900).

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **44, 114ff. (1905).

***) Fischer und Piloty, Berichte d. deutsch. chem. Ges. **24**, 521 (1891).

†) Virchows Archiv **121** (1890).

von der glykosidischen Struktur nicht anwendbar ist, da die Verbindung Fehlingsche Lösung direkt reduziert.

In letzter Zeit ist durch die Untersuchungen von M. Jaffé*) ein Glykuronsäurederivat der Dimethylamidobenzoesäure bekannt geworden, welches die Eigenschaft hat, schon beim längeren Kochen mit Wasser in seine Bestandteile zu zerfallen. Ich habe mich mit dieser Verbindung**) ebenfalls beschäftigt und die gleiche Beobachtung gemacht. Durch Erwärmen mit verdünnter Essigsäure wird die Verbindung nicht verändert. Ich habe nun die Einwirkung von Emulsin untersucht und gefunden, daß Emulsin keine spaltende Wirkung ausübt.

0,1 g des Glykuronsäurederivates wurden in 100 ccm mit Essigsäure schwach sauer gemachtem destillierten Wasser unter Erwärmen gelöst: beim Abkühlen trat keine Ausscheidung von p-Dimethylamidobenzoesäure ein, welche in kalter Essigsäure unlöslich ist. Nun wurde 0,5 g Emulsin mit Wasser verrieben zugefügt und die Mischung über Nacht in den Brutofen bei 36° gestellt. Am nächsten Tage wurde unter Eiskühlung mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht und filtriert; das klare Filtrat, zeigte auf Zusatz von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion eine schwache Trübung, die beim Erwärmen nicht verschwand, sich vielmehr durch Filtrieren der heißen Lösung entfernen ließ, also nicht durch entstandene p Dimethylamidobenzoesäure bedingt war. Auch beim Abkühlen und weiterem Zusatz von Essigsäure blieb das Filtrat klar. Bei mehrstündigem Kochen am Rückflußkühler nach vorheriger Neutralisation hatte eine Spaltung stattgefunden; beim Abkühlen und Ansäuern mit Essigsäure schied sich nunmehr die p-Dimethylamidobenzoesäure aus.

Ich möchte nach diesem Versuch bezweifeln, daß die vorliegende Verbindung glykosidische Struktur besitzt, wie Jaffé***) annimmt (cfr. Formel I). Wahrscheinlicher erscheint mir bei der bekannten Neigung des Stickstoffs in der Dimethylamidobenzoesäure, in den fünfwertigen Zustand überzugehen, die Formel II, welche die Verbindung ebenfalls als einbasische Säure charakterisieren würde: $C_{15}H_{19}NO_8$.

I.
$CH . OOC . C_6H_4 N(CH_3)_2$
O $(CHOH)_2$
CH
CHOH
COOH

II.
$(CH_3)_2$
$N . C_6H_4 . COOH$
CO (H)
$[CHOH]_4$
CO(OH)

Mit Rücksicht hierauf schien es mir von Interesse, das Verhalten der Trimethylamidobenzoesäure (p-Benzbetain) im Warm-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **43**, 374ff. (1905).
**) Vgl. vorstehende Abhandlung.
***) loc. cit. S. 388.

blüterorganismus einer Prüfung zu unterziehen. Der Stickstoff ist hier bereits fünfwertig; in ihren Salzen könnte freilich in ähnlicher Weise wie beim gewöhnlichen Betain bereits eine Aufspaltung des Ringes vorliegen:

$$\begin{array}{l} CH_2-N(CH_3)_3 \\ \;| \qquad\quad | \\ CO - O \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} CH_2-N(CH_3)_2 \, . \, HCl \\ \;| \\ CO-O-CH_3 \end{array}$$

während durch Alkali diese Ringbildung wieder stattfände. Man muß sich also gleichwohl vorstellen, daß im Organismus jedenfalls das Benzbetain als solches kreist. Nun könnte sich weder an den bereits fünfwertigen Stickstoff das Molekül der Glykuronsäure anlagern noch an die nicht mehr freie Karboxylgruppe im *Jaffé*schen Sinne.

Der Harn des Kaninchens, dem ich an zwei Tagen zusammen 4 g des Benzbetainjodhydrats in Lösung eingegeben hatte, wurde in zwei Portionen getrennt verarbeitet, und zwar die eine auf nicht gepaarte Verbindung, die andere auf mit Glykuronsäure gepaarte.

Portion I. Der infolge Haferfütterung sauer reagierende Harn wurde mit Jodwasserstoffsäure versetzt und von dem geringfügigen Niederschlage abfiltriert; der Niederschlag wurde in Alkali gelöst, filtriert und mit Essigsäure angesäuert; *keine p-Dimethylamidobenzoesäure.* Das jodwasserstoffsaure Filtrat wird mit Jod versetzt zur Darstellung des Perjodids nach *Willstätter* und *Kahn.* Der Niederschlag wurde mit Wasserdampf zersetzt und lieferte 0,4 g Benzbetainjodhydrat.

Portion II. Behandlung nach dem Bleiverfahren; der basische Bleiniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, heiß filtriert und noch zweimal ausgekocht; beim Abkühlen schied sich auch nach dem Einengen nichts aus. Die Flüssigkeit reduzierte nur schwach *Fehling*sche Lösung. Zur Zersetzung der etwa darin enthaltenen gepaarten Verbindung wurde einige Stunden am Rückflußkühler gekocht und auf das Vorhandensein von Di- bzw. Trimethylamidobenzoesäure geprüft. Es war nur eine kleine Menge der Dimethylverbindung nachzuweisen.

Aus den Versuchen ist zu schließen, daß Benzbetain keine Paarung mit Glykuronsäure eingeht, vielmehr zu nicht unbeträchtlichem Teile unverändert im Harn erscheint; ein ganz geringfügiger Teil erfährt eine Entmethylierung zur Dimethylverbindung, während ein anderer Teil wohl als Monomethylamidobenzoesäure entsprechend dem Befunde von *Jaffé* den Organismus verläßt.

Bei meinen Versuchen zur Spaltung der nach Thymotinpiperidid entstehenden Glykuronsäuren habe ich auch die Einwirkung der *Hefe* geprüft. Ich habe wiederholt, wenn auch nicht regelmäßig, beobachtet, daß frische Hefe sowohl wie die im Handel als „*Zymin*“ erhältliche Dauerhefe imstande ist, die gepaarte Verbindung zu spalten, auch wenn ich durch Zusatz von *Chloroform* (*E. Fischer*) oder *1 Proz. Toluol* (*E. Buchner*) die Mitwirkung von Bakterien ausschloß. Auf Grund der Unter-

suchungen von E. *Fischer**) über die Spaltung von Glykosiden durch Enzyme könnte man annehmen, daß in der gepaarten Verbindung wechselnde Mengen zweier stereoisomerer Formen — entsprechend den α- und β-Glykosiden — vorliegen, welche sich nur durch die Anordnung an dem asymmetrischen Kohlenstoff der Glykosidogruppe unterscheiden würden:

```
   H—C—O.R          R.O—C—H
    / CHOH            / CHOH
  O<  CHOH          O<  CHOH
    \ CH              \ CH
      CHOH              CHOH
      COOH              COOH
```

Der eine Typus wird nur durch Hefenenzyme, der andere nur durch Emulsin gespalten.

Durch beide Arten Enzyme wurden die Glykoside des *Glycerins* und *Benzylalkohols***) gespalten; es handelt sich hierbei um Gemische der α- und β-Verbindung. Es war nun wohl möglich, daß die bei der spontanen Ausscheidung der nach Eingabe von Thymotinpiperidid entstehenden Verbindung im Harn *gelöst* bleibenden Mengen dem *anderen Typus* entsprachen; doch haben mir direkte Versuche gezeigt, daß auch diese Anteile durch Einwirkung beider Agentien gespalten werden können. Ich kann mich der Annahme nicht verschließen, daß die von mir untersuchte gepaarte Verbindung beide Typen in ihrer Konfiguration repräsentiert. Es wird durch weitere Untersuchungen festzustellen sein, ob auch andere gepaarte Verbindungen das analoge Verhalten zeigen.

Bei diesen Versuchen mit Hefe machte ich eine Beobachtung, die mir von größter Bedeutung zu sein scheint.

Wenn ich der mit Hefe bzw. Zymin behandelten Flüssigkeit nach dem Alkalischmachen das Spaltungsprodukt, die methylierte Base, entzogen hatte, zeigte die filtrierte Lösung beim Kochen mit *Fehling*scher Lösung keine Reduktion, die doch bei Vorhandensein von Glykuronsäure hätte eintreten müssen; ein gleiches war der Fall, wenn ich das Ausschütteln der Flüssigkeit mit Äther unterließ und direkt die alkalisch gemachte Flüssigkeit auf Reduktionsfähigkeit untersuchte. Dies veranlaßte mich, einige Versuche über die Einwirkung der Hefe auf freie Glykuronsäure anzustellen. Ich fand, daß die bei der Spaltung der p-Dimethylamidobenzoeglykuronsäure entstehende freie Glykuronsäure ein

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 27, 2985 ff. (1894).

**) Ibidem S. 2987.

gleiches Verhalten zeigte. Weitere Versuche habe ich mit einem mir von Prof. H. Thierfelder in Berlin überlassenen Präparate von glykuronsaurem Kali angestellt.

Wenn ich eine Menge von etwa 0,08 g in Lösung der Einwirkung von Hefe oder Zymin im Gährkölbchen unterwarf, so hatte sich am nächsten Tage etwa 1 ccm Gas angesammelt, freilich nur ein kleiner Teil der Menge Gas, welche ich bei Vergährung der gleichen Menge Traubenzucker fand. Die Flüssigkeit wurde alkalisch gemacht, filtriert und das Filtrat auf Reduktionsfähigkeit geprüft. Es reduzierte nicht, während eine kleine Menge Glykuronsäurelösung, die ebenfalls mit Weinsäure angesäuert über Nacht im Thermostaten gestanden hatte, kräftige Reduktion der Fehlingschen Lösung zeigte. Die Gasentwicklung trat auch ein, wenn ich der Flüssigkeit 1 Proz. Toluol zusetzte.

Wenn die Vergährung der Glykuronsäure analog der der Glykose verläuft, so war das Auftreten von Essigsäure zu erwarten. Nach den Untersuchungen von E. Buchner*) schwankt der Essigsäuregehalt des frischen Hefepreßsaftes zwischen 0,004 und 0,010 Proz.; nach viertägigem Stehen bei 15 bis 22° ohne Zuckerzusatz war derselbe auf 0,03 bis 0,04, mit Zuckerzusatz aber auf 0,08 bis 0,29 Proz. gestiegen.

Da ich meine Versuche mit „Zymin" ausführte, habe ich zunächst festgestellt, ob beim Stehenlassen einer Zyminemulsion in der Wärme flüchtige Säuren auftreten.

Ich benutzte 1 g Zymin; in der außerdem mit 0,1 g glykuronsaurem Kali in Lösung versetzten Flüssigkeit wurde ebenfalls die Menge der nach 16 Stunden entstandenen flüchtigen Säuren bestimmt. Nach Beendigung des Versuches wurde ohne anzusäuern mit Wasserdampf destilliert, das Destillat mit Baryumkarbonat zur Vertreibung der Kohlensäure gekocht. Nach dem Abfiltrieren des Ungelösten wurde eingedampft, mit Phosphorsäure angesäuert, destilliert und mit $\frac{n}{10}$-Natronlauge titriert. Ich befolgte bei diesen Operationen die von E. Buchner und Meisenheimer**) benutzte Methodik.

Während im Falle der Probe mit Zymin die Menge der flüchtigen Säuren nur geringfügig war, gingen im Falle der mit Glykuronsäure versetzten Lösung beträchtliche Mengen über. Bei den kleinen Mengen Glykuronsäure, die mir zur Verfügung standen, habe ich auf eine quantitative Bestimmung der Essigsäure verzichtet und mich auf den qualitativen Nachweis beschränkt. Während in der Kontrollprobe nach dem Eindampfen des Kalisalzes durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure kaum ein Geruch von Essigsäure auftrat, war ein solcher unverkennbar im Falle der Probe mit Glykuronsäure; ebenso beim Erwärmen mit zugesetztem Alkohol das Auftreten von Essigäther.

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 37, 417 ff. (1904).

**) Ibidem S. 425.

Auf das Auftreten von Milchsäure, welche nach den Untersuchungen der genannten Autoren bei der Spaltung des Zuckers eine große Rolle spielt und wahrscheinlich als Zwischenprodukt der alkoholischen Gährung zu betrachten ist, habe ich noch nicht meine Untersuchungen erstreckt; sie würde im Destillationsrückstande zu suchen sein. Ihr Auftreten neben der Essigsäure erscheint nicht unwahrscheinlich, wenn wir uns den Vorgang des Abbaues des Moleküls der Glykuronsäure analog dem der Glykose nach den Anschauungen Buchners*) denken.

CHO	OH OH		COOH			COOH	OH		CO_2
CH.OH			CH.OH			CH.OH	H	→	CH_2OH
CH.OH	H H	→	CH_2	H	→	CH_3			CH_3
CH.OH	OH		CO	OH		COOH	OH		CO_2
CH.OH	OH		CH.OH			CH.OH	H	→	CH_2OH
CH_2.OH	H H		CH_3			CH_3			CH_3
Glykose + $4H_2O$			Hypothetisches Zwischenpr. + H_2O			2 Mol. Milchsäure			

CHO	OH OH		COOH			COOH	OH		CO_2
CH.OH			CH.OH			CH.OH	H	→	CH_2OH
CH.OH	H H	→	CH_2	H		CH_3			CH_3
CH.OH	OH		CO	OH		COOH	OH		CO_2
CH.OH	H		CH_2			CH_2	H	→	CH_3
COOH			COOH			COOH			COOH
Glykuronsäure + $3H_2O$			Hypothetisches Zwischenpr. + H_2O			1 Mol. Milchsäure 1 Mol. Zwischenpr.: Malonsäure			

Vielleicht ist auch die von E. Buchner beobachtete Bildung von Essigsäure bei Zusatz von Zucker zum Hefepreßsaft auf eine teilweise Oxydation der Alkoholgruppe des Traubenzuckers zu COOH zu beziehen. Die bei der Spaltung der Glykuronsäure durch Hefe beobachtete Geringfügigkeit der CO_2-Entwicklung könnte darauf beruhen, daß viel ungespaltene Milchsäure und Malonsäure entsteht; von letzterer ist bekannt, daß sie bei höherer Temperatur in Kohlensäure und Essigsäure zerfällt; es ist nicht ausgeschlossen, daß die beim Destillieren der Gährflüssigkeit gewonnene Essigsäure von einer Spaltung anwesender Malonsäure herrührt. Hierauf wird bei weiterer Untersuchung Rücksicht zu nehmen sein.

Es ist mir nicht möglich gewesen, festzustellen, von wem die Angabe herrührt, daß Glykuronsäure durch Hefe nicht

---

*) loc. cit. S. 422.

verändert würde; sie ist in die bekannteren Lehrbücher übergegangen, und es haben mehrere Autoren den Befund, daß eine Flüssigkeit nach dem Vergähren mit Hefe nicht mehr reduzierte, dahin gedeutet, daß die untersuchte Flüssigkeit keine freie Glykuronsäure, sondern Traubenzucker enthalten habe.

C. Brahm*) hat vor einigen Jahren das α-Methylglykosid an Kaninchen verfüttert und den Harn der Tiere nach dem Spalten mit Mineralsäuren rechtsdrehend und stark reduzierend befunden; nach dem Vergähren mit Hefe reduzierte die Flüssigkeit nicht mehr. Er nimmt hiernach an, daß das α-Methylglykosid im Organismus nicht zur Methylalkoholglykuronsäure oxydiert, sondern unverändert ausgeschieden werde. Nun gehört das α-Methylglykosid zu dem Typus derjenigen Glykoside, welche durch Invertin, nicht durch Emulsin wie die aromatischen Glykoside (Salicin, Coniferin, Phloridzin) und die gepaarten Glykuronsäuren gespalten werden. Daß übrigens die Entstehung einer Methylalkoholglykuronsäure (der β-Reihe) möglich ist, erscheint nach den Untersuchungen von O. Neubauer**) recht unwahrscheinlich, da gerade nach Darreichung von Methylalkohol auch nicht Spuren einer gepaarten Verbindung nachweisbar waren.

Eine große Anzahl natürlich vorkommender und künstlich dargestellter Glykoside ist auf ihr Schicksal im tierischen Organismus geprüft worden. Es hat sich nun gezeigt, daß alle bisher untersuchten Glykoside im Stoffwechsel zerfallen; zum Teil, wie Phloridzin und Amygdalin unter schwerer Stoffwechselstörung bzw. Zerfall in die giftige Komponente. Es spielen hierbei Spaltungsvorgänge im Magendarmkanale sicher eine Rolle; Phloridzin wird zwar auch bei subkutaner Injektion gespalten, Amygdalin hingegen nicht, wie ich***) bereits vor einer Reihe von Jahren feststellte. Es erscheint auffallend, daß es bisher nicht gelungen ist, ein natürlich vorkommendes oder künstlich dargestelltes Glykosid mittelst der Passage durch den Tierkörper in die entsprechende Glykuronsäure überzuführen, was doch möglich sein müßte, da beide Gruppen von Körpern durch ihr Verhalten gegen Enzyme die analoge Konstitution (der β-Reihe) aufweisen. Ein einziges Glykosid ist bekannt, welches auch durch Invertin eine — partielle — Spaltung erfährt, nämlich das Amygdalin, die Mandelsäurenitrildiglykose; durch Hefe wird ein Molekül Glykose abge-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **28** (1899).

) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. **46 (1901).

***) Virchows Archiv **131** (1892).

spalten, und es entsteht das Amygdonitrilglykosid, das durch Emulsin Bittermandelöl, Blausäure, Glykose gibt [E. Fischer*)]. So zeigt es sich, daß die Ausnahme nur eine scheinbare ist, da auch andere Polysaccharide, wie auch die Maltose, durch Invertin gespalten werden.

E. Gérard**) fand, daß wässerige Auszüge von Nieren und Leber vom Pferd und Kaninchen nach Art des Emulsins das Salicin und Amygdalin zu zersetzen vermögen; die gekochten Auszüge tun das nicht mehr. Es erscheint mir freilich bedenklich, ein derartiges Ergebnis auf die Verhältnisse im Organismus zu übertragen, da ich gelegentlich festgestellt habe, daß die Thymotin-Piperidid-Glykuronsäure-Verbindung in vitro durch gewisse Organe des Kaninchens eine Spaltung erfährt, also desselben Tieres, welches die Synthese bewirkt. Auch die Fäulnis scheint gepaarte Glykuronsäuren in analoger Weise zu zerlegen wie Glykoside, wofür die Resultate von M. Bial***) mit Mentholglykuronsäure sprechen.

Eine große Literatur hat die Frage veranlaßt, ob überhaupt die Glykuronsäure als Oxydationsprodukt des Traubenzuckers in dem Sinne aufzufassen sei, daß er sich als solcher an die zu paarende Substanz anlagere unter späterer Oxydation der Alkoholgruppe zu COOH. Die neueren Versuche, welche ausgeführt wurden, um zu entscheiden, ob die Glykuronsäure aus dem Traubenzucker stamme, scheinen mir nicht beweiskräftig zu sein, besonders die von Loewi†), der durch Fütterung von maximal phloridzinvergifteten Tieren mit Kampfer erhebliche Glykuronsäurepaarung erzielte, ohne daß die Ausscheidung des Traubenzuckers absank; ebensowenig die v. Fenyvessys††), der in einigen Versuchen durch Verfütterung von Traubenzucker die Glykuronsäurebildung nicht zu erhöhen vermochte, da er zu seinen Versuchen Substanzen benutzte, die nur zum kleinen Teile die Paarung mit Glykuronsäure eingehen. Als beweiskräftig dagegen dürften die von mir mitgeteilten Versuche anzusehen sein, nach denen es gelingt, durch Zufuhr von Traubenzucker die Giftigkeit der eingeführten Substanz herabzusetzen, eine Beobachtung, die Geelmuyden†††) sogar in Parallele stellt zu der Wirkung der Kohlehydrate gegenüber Acetonkörpern.

---

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **28**, 1508 (1895).
) Compt. r. soc. biol. **99 (1901).
***) Zeitschr. f. physiol. Chemie **45**, 262 (1905).
†) Archiv f. exper. Path. u. Pharm. **47**, 56 (1902).
††) Archives Internat. de Pharmakodyn. **12** (1904).
†††) Zeitschr. f. physiol. Chemie **41**, 139 (1904).

In meinen Versuchen, durch Zufuhr glykogenbildender Zucker den eingeführten Paarling zu entgiften, war die Dosis so gewählt, daß eben sicher eine giftige akute Wirkung am Kontrolltiere erzielt wurde; bei den von mir benutzten Piperidinderivaten liegt nun diese Dosis nicht erheblich über derjenigen, welche noch, ohne schwere Symptome zu erzeugen, vertragen wird. Es ist also nur eine verhältnismäßig geringe Menge an die Substanz zu paarender Glykuronsäure nötig, um den die Giftwirkung bedingenden Anteil zu paralysieren. Ein Nachweis, daß durch die Zufuhr von Traubenzucker in vermehrter Menge die Ausscheidung der gepaarten Verbindung erfolge, wie v. Fenyvessy fordert, könnte somit nur das Ergebnis haben, daß eine geringfügige Vermehrung der gepaarten Verbindung erfolgt.

Es spricht bisher keine Tatsache dagegen, daß die von E. Fischer und Piloty*) und schon früher von Sundvik**) geäußerte Anschauung zu Recht besteht, wonach an die dem Organismus zugeführte Substanz zunächst Traubenzucker sich anlagert, dessen Alkoholgruppe durch Oxydation in CO OH übergeht. Wie schon Brahm bemerkt, könnte das Verhalten der Glykoside im Organismus eine weitere Stütze für diese Anschauung liefern. Indes schien es mir richtiger, zu den Versuchen Glykoside der β-Reihe zu wählen, weil nur diese eine Übereinstimmung mit den gepaarten Glykuronsäureverbindungen erkennen lassen. Ein solcher Versuch ist bereits von A. Falck***) gemacht worden, welcher das Phenolglykosid verfütterte; er fand in dem von den Tieren gelassenen Harne gepaarte Glykuronsäuren, die aber wohl nach einem vorhergehenden Zerfalle des Glykosides entstanden sind, da auch nach Einspritzung kleiner Mengen Phenol jene Verbindung auftritt. Da Falck fand, daß nach Einspritzung von 2 g Phenolglykosid unter die Haut im Harn Zucker nachweisbar ist, erscheint eine Spaltung des Glykosides auch bei subkutaner Zufuhr sicher, wenn sie auch nicht schnell erfolgen kann, weil sonst die krampferregenden Wirkungen des Phenols hätten eintreten müssen. Mir scheint aus diesen Versuchen hervorzugehen, daß es von der Konstitution des Paarlings abhängt, ob bei der Passage durch den Tierkörper das Glykosid gespalten wird; hierfür spricht besonders der von Falck mitgeteilte Versuch mit Benzylglykosid; er fand nach dessen Einfuhr keine gepaarten Glykuronsäuren, wohl aber Hippursäuren, wie sie nach den Untersuchungen von

---

*) loc. cit. S. 524.

**) Akadem. Abhandlung. Helsingfors 1886.

***) Münch. med. Wochenschr. Nr. 36 (1902).

Schmiedeberg*) nach Eingabe von Benzylalkohol auftreten. Beim Benzylglykosid ist also die Spaltung sicher eine vollkommene gewesen, beim Phenolglykosid vielleicht nicht ganz vollständig. Eine vollständige Spaltung erfährt im Organismus das Salicin, das Glykosid des der Salicylsäure entsprechenden Oxyalkohols Saligenin, unter gleichzeitiger Oxydation der Alkoholgruppe. Hiermit stimmt die s. Z. von mir gemachte Beobachtung, daß die Salicylsäure im Organismus des Kaninchens keine Paarung mit Glykuronsäure erfährt. Wohl aber geht die p-Oxybenzoesäure eine solche Paarung ein.

Ich suchte nun nach solchen natürlich vorkommenden Glykosiden, in welchen die Bedingung erfüllt ist, daß in p-Stellung zu dem an die Glykose gebundenen Phenolhydroxyl ein Atomkomplex sich befindet, dessen Oxydation im Tierkörper zu COOH möglich ist. Von derartigen Glykosiden sind zwei bekannt, das Syringin und das Coniferin; das erstere leitet sich ab von dem aromatischen Alkohol Syringenin**), das letztere vom Coniferylalkohol, welcher ein in der Allylseitenkette oxydiertes Eugenol darstellt; Tiemann***) zeigte, daß er durch Behandeln mit Natriumamalgam zu Eugenol reduziert wird.

Syringenin	Coniferylalkohol
OH — C; $H_3CO.C$ ⟨ ⟩ $C.OCH_3$; HC ⟨ ⟩ CH; C — $CH:CH.CH_2OH$	OH — C; $H_3CO.C$ ⟨ ⟩ CH; HC ⟨ ⟩ CH; C — $CHOH.CH:CH_2$

Hinsichtlich der Seitenketten würden sich beide Alkohole ebenso unterscheiden wie Anethol und Eugenol;

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CH=CH-CH_3\\OCH_3\end{matrix}\right. \qquad \left.\begin{matrix}HO\\H_3CO\end{matrix}\right\} C_6H_3.CH_2.CH:CH_2$$

wie Isosafrol und Safrol und dessen Oxydationsprodukt Cubebin:

$$C_6H_3\left\langle\begin{matrix}CH=CH.CH_3\\ \left.\begin{matrix}O\\O\end{matrix}\right>CH_2\end{matrix}\right. \qquad C_6H_3\left\langle\begin{matrix}CH_2-CH=CH_2\\ \left.\begin{matrix}O\\O\end{matrix}\right>CH_2\end{matrix}\right. \qquad C_6H_3\left\langle\begin{matrix}CHOH.CH=CH_2\\ \left.\begin{matrix}O\\O\end{matrix}\right>CH_2\end{matrix}\right.$$

Wir haben also zwei Typen von Verbindungen, die sich durch eine andersartige Konstitution der Seitenkette unterscheiden: Beim Syringenin, Anethol, Isosafrol die Propenylgruppe mit der Doppelbindung näher am Benzolring, bei den anderen die Allylgruppe mit der doppelten Bindung am Ende.

*) Archiv f. exper. Pharm. u. Path. **14**, 291 (1881).
) J. Gadamer, Archiv d. Pharmazie **235, 577 (1897).
***) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **9**, 418 (1876).

Das Anethol wird, wie die Untersuchungen von Kühling*) und Giacosa**) gezeigt haben, im Organismus zu Anissäure oxydiert; nach Darreichung von Isosafrol fand A. Heffter***) Piperonylsäure im Harn der Tiere.

Von den dem Allyltypus angehörigen Verbindungen geht das Safrol ebenfalls in Piperonylsäure über; bei Cubebin, dem in der Seitenkette oxydierten Safrol, konnte die gleiche Oxydation nicht festgestellt werden, da es kaum resorbiert wurde (Heffter). Eine Ausnahme macht das Eugenol; es widerstrebt den Oxydationen des Organismus vollständig und verläßt nach De Regibus†) und Kühling den Tierkörper zum größten Teil in Form einer Ätherschwefelsäure; dieses abweichende Verhalten des Eugenols dürfte durch die Hydroxylgruppe bedingt sein, welche die Widerstandskraft solcher Körper gegen Oxydationsmittel erhöht.

Auf Grund dieser Erfahrungen hielt ich es wohl für möglich, daß beim Syringin sowohl wie beim Coniferin eine vollständige Oxydation der Seitenkette im Organismus erfolgt; es konnten somit als Endprodukte Syringasäure und Vanillinsäure auftreten. Die Syringasäure hat die Eigenschaft, mit Fe_2Cl_6 eine Rotfärbung zu geben, nicht so die Vanillinsäure.

Die Vanillinsäure ist von Tiemann und Reimer††) durch Oxydation des Coniferin mit Kaliumpermanganat erhalten worden, wobei zuerst die Oxydation der Allylseitenkette erfolgt, sodaß zunächst Glykovanillinsäure entsteht. Die Syringasäure ist zuerst von G. Körner†††) aus Syringin erhalten worden; J. Gadamer*†) erhielt sie aus der Sinapinsäure, der dem Syringenin entsprechenden Säure über die Acetylverbindung mittels Kaliumpermanganat. C. Graebe und E. Martz**†) erhielten sie durch partielles Entmethylieren der Trimethylgallussäure. Bald darauf gelang denselben Autoren***†) die Synthese des Syringaaldehyds und der Sinapinsäure, indem sie den Pyrogalloldimethyläther durch Erwärmen mit Chloroform und Ätznatron nach der Reimerschen Aldehydsynthese in den Aldehyd verwandelten; der Syringaaldehyd wurde dann in Sinapinsäure übergeführt.

---

*) Inaug.-Diss. Berlin 1887.

) Ann. di Chim. e di Farmacol. **11, 304 (1890).

***) Archiv f. exper. Path. u. Pharm. **35** (1895).

†) Tesi. Turino 1885.

††) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **8**, 515 (1875).

†††) Gaz. chim. ital. **18**, 209 bis 219.

*†) loc. cit. S. 572.

†) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **36, 215 (1903).

***†) loc. cit. S. 1031.

$$\underset{\substack{\text{Pyrogallol-}\\\text{dimethyl-}\\\text{äther}}}{HO\langle\,\rangle(OCH_3)_2} \longrightarrow \underset{\text{Syringaaldehyd}}{HO\langle\,\rangle(H_3CO)_2.COH} \longrightarrow \underset{\text{Sinapinsäure}}{HO\langle\,\rangle(OCH_3)_2CH:CH.COOH} \longrightarrow \underset{\text{Syringasäure}}{HO\langle\,\rangle(OCH_3)_2COOH}$$

Da nach den oben erwähnten Untersuchungen Gadamers die Sinapinsäure in Syringasäure übergeführt werden kann, so war es recht wahrscheinlich, daß im Organismus aus Syringaaldehyd direkt Syringasäure entstehen würde, in derselben Weise wie nach den Untersuchungen von C. Preuße*) Vanillin im Organismus in Vanillinsäure übergeht. Preuße hat bei seinen Untersuchungen über Vanillin nur auf die Bildung der Ätherschwefelsäure und die Oxydation zur Vanillinsäure Rücksicht genommen. Ich fand, daß nach Einfuhr von Vanillin erhebliche Mengen einer gepaarten Glykuronsäure entstehen, aus der man durch Spaltung mittels Mineralsäuren oder Emulsin die freie Vanillinsäure abspalten kann. Durch die kürzlich erschienene Untersuchung von V. Kotake**) erhalten meine Ergebnisse eine Bestätigung.

Den Syringaaldehyd stellte ich wie Graebe und Martz nach der Reimerschen Methode aus dem vom Verein für chemische Industrie in Frankfurt a. M. bezogenen Pyrogalloldimethyläther dar. Wenn ich nach Beendigung der Reaktion mit Schwefelsäure sauer machte, fiel eine dickflüssige Masse aus; sie wurde in wenig Alkohol gelöst und mit viel Äther kräftig durchgeschüttelt. Nach mehrstündigem Stehen schieden sich reichliche rotbraune Kristalle aus, die nach dem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol bei 113° schmolzen. Ich konnte also die vorherige Überführung des Aldehyds in die Bisulfitverbindung unterlassen, wie die genaue Vorschrift von Graebe und Martz lautet.

Ich habe den Syringaaldehyd an Kaninchen verfüttert und festgestellt, daß reichliche Mengen einer gepaarten Glykuronsäure neben freier Syringasäure im Harn der Tiere erschienen.

Der durch Bleiessig erzeugte voluminöse Niederschlag wurde nach wiederholtem Waschen mit destilliertem Wasser mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt und schließlich das Kalisalz der gepaarten Verbindung erhalten. Es war jedoch noch mit viel anorganischen Bestandteilen verunreinigt; die eingeengte Flüssigkeit konnte durch Absaugen von diesen befreit werden. Die Lösung, welche die gepaarte Verbindung enthielt, wurde

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **4**, 213 (1880).
) Zeitschr. f. physiol. Chemie **45, 320 (1905).

nochmals dem Bleiverfahren unterworfen und nunmehr ein von anorganischen Bestandteilen freies Kalisalz gewonnen. Die Lösung des Salzes gab die Pentosenreaktion. Bei der Spaltung mit Emulsin erhielt ich durch Ausäthern der sauer gemachten Flüssigkeit die Syringasäure vom Schmelzpunkt 202; ihre Lösung wurde durch Fe_2Cl_6 rotbraun gefärbt.

0,125 g Kalisalz : 0,047 SO_4K_2
Berechnet für $C_{15}H_{18}O_{12}K_2$: K = 16,66 Proz.
" " $C_{15}H_{16}O_{11}K_2$: K = 17,33 "
Gefunden: K = 16,88 "

Wie der für K ermittelte Wert zeigt, könnte die Paarung sowohl mit wie ohne Wasseraustritt erfolgt sein. Die Darstellung der entsprechenden freien Säure gelang mir nicht. Auf Grund der Spaltbarkeit durch Emulsin möchte ich für die Verbindung die glykosidische Struktur annehmen. Durch den nunmehr festgestellten Übergang der Aldehyde Syringaaldehyd und Vanillin in die entsprechenden Glykuronsäurederivate unter Oxydation der Aldehydgruppe zu COOH, bietet sich Gelegenheit, zu entscheiden, ob nach Einfuhr der entsprechenden Glykoside Syringin und Coniferin die gleichen Verbindungen entstehen; ist das der Fall, so war damit gleichzeitig nachgewiesen, daß die Propenyl- bzw. Allyl-Seitenkette des Syringins bzw. Coniferins entsprechend den bisherigen Erfahrungen zu COOH oxydiert werden. Die für unsere Frage aber noch wichtigere Entscheidung war die, ob und welche Produkte bei der Einfuhr von Syringin und Coniferin sonst noch entstehen. Die meisten in dieser Beziehung erforderlichen Versuche habe ich mit dem Syringin angestellt, da, wenn es sich um den Nachweis kleiner Mengen handelte, in der typischen Farbenreaktion der Syringasäure ein wichtiges Hilfsmittel gegeben war.

In einigen Versuchen gab ich Syringin innerlich; mit Rücksicht auf die Eigenschaft mancher Glykoside, durch Fäulnis gespalten zu werden, war es möglich, daß im Harne der Tiere freie Syringasäure auftritt. Wenn man den frisch gelassenen Harn der Tiere mit neutralem Bleiacetat ausfällt, so kann in diesem Niederschlage infolge der Unlöslichkeit ihres Bleisalzes sich Syringasäure finden. Die Verarbeitung ergab in der Tat ein positives Resultat; die Menge der gefundenen Säure war nach Verfütterung von 5 g Syringin 0,1 g; sie konnte durch den Schmelzpunkt identifiziert werden. Findet man nun gepaarte Glykuronsäure, so könnte man sagen, es sei im Organismus eine Spaltung des Syringins in den zugehörigen Alkohol Syringenin (cfr. oben) und Traubenzucker erfolgt; Syringenin sei dann weiter, zum Teil unter Paarung mit Glykuronsäure, zu Syringasäure oxydiert worden.

Aus diesem Grunde habe ich in den weiteren Versuchen das Syringin subkutan einverleibt. Da es nur im warmen Wasser löslich ist, so habe ich die wässerige Lösung den Kaninchen in Mengen von je 10 ccm unter die Rückenhaut körperwarm injiziert. Ich injizierte täglich 2 bis 3 g. Nun ist durch neuere Untersuchungen von M. Bial*) am Hunde mit Gallenfistel festgestellt, daß wenigstens nach subkutaner Darreichung von Menthol in der Galle die gepaarte Verbindung nachgewiesen werden kann. Hiernach wäre auch bei der subkutanen Injektion des Glykosides der Einwand zulässig, daß die Verbindung zunächst mittels der Galle in den Darm gelange, dort gespalten werde, um dann durch Wiederanlagerung der Glykuronsäure als gepaarte Verbindung durch die Nieren den Organismus zu verlassen. Wenn dem so war, so mußte das Verhalten der Stoffwechselprodukte des Syringin das gleiche sein wie bei innerlicher Darreichung. Indes war der Erfolg der subkutanen Injektion ein durchaus anderer. Ich konnte freie Syringasäure im Harn der injizierten Tiere nicht nachweisen.

Der durch basisches Bleiacetat erhaltene Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen und auf das Kalisalz der gepaarten Verbindung verarbeitet. Beim Einengen im Vakuum schieden sich reichliche Mengen anorganischer Stoffe ab, die durch Absaugen abgeschieden wurden. Das Filtrat wurde von neuem eingedunstet und, da sich auch jetzt nichts Kristallinisches ausschied, völlig getrocknet. Nun wandte ich ein Verfahren an, das sich mir zuerst bei der Darstellung des kamphenglykolmonoglykuronsauren Kali**) bewährt hatte. Die trockene Masse wurde wiederholt mit heißem absoluten Alkohol extrahiert, die filtrierten Extrakte durch Abdestillieren des Alkohols konzentriert. Beim Abkühlen schied sich eine schneeweiße Masse ab, in welcher ich die gesuchte gepaarte Verbindung vermutete.

0,164 g Kalisalz: 0,034 g SO_4K_2.
Gefunden: K = 9,29 Proz.
Berechnet für $C_{15}H_{16}O_{11}K_2$: K = 17,33 Proz.
„ „ $C_{15}H_{19}O_{10}K$: K = 9,7 Proz.

Die Analyse weicht erheblich von dem für syringaglykuronsaures Kali berechneten Kaliwerte ab, stimmt hingegen auf das Kalisalz der von Körner***) durch Oxydation des Syringins mit Kaliumpermanganat erhaltenen Glykosyringasäure; es gelang mir durch Zerlegung des Bleisalzes mit Schwefelwasserstoff diese

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **45**, 258ff. (1905).
) Zeitschr. f. physiol. Chemie **36, 447 (1902).
***) loc. cit.

Säure darzustellen und sie durch den übereinstimmenden Schmelzpunkt (208°) zu identifizieren. Sie gab dementsprechend nicht die Pentosenreaktion. Durch Spaltung mit Emulsin erhielt ich aus ihr die Syringasäure.

Der durch wiederholte Extraktion mit absolutem Alkohol von der eben beschriebenen Verbindung befreite Rückstand wurde in Wasser gelöst und nochmals dem Bleiverfahren unterworfen und nunmehr ein Kalisalz erhalten, welches deutlich die Pentosenreaktion zeigte.

0,131 g Substanz: 0,050 SO_4K_2
Gefunden: K = 17,10 Proz.

Dem Kaligehalt nach sowie nach ihrem sonstigen Verhalten liegt hier syringaglykuronsaures Kali vor. Durch Spaltung mit Emulsin habe ich auch hier Syringasäure erhalten.

Bei den Versuchen mit Coniferin bin ich in derselben Weise verfahren wie im Falle des Syringin. Es gelang mir auch im Falle des Coniferin nicht, nach subkutaner Injektion das Auftreten von freier Vanillinsäure im Harn nachzuweisen. Da keine typische Reaktion für Vanillinsäure bekannt ist, so war ich auf die Darstellung der Vanillinsäure selbst oder ihrer Salze angewiesen. Nach den Untersuchungen von F. Tiemann*) gibt sie ein Bleisalz und ein Silbersalz. Ersteres ist in Wasser unlöslich. Durch Zersetzen des Bleisalzes mit SH_2 kann man Vanillinsäure selbst gewinnen. Es gelang mir auch so nicht, Vanillinsäure im Harn nach subkutaner Zufuhr von Coniferin nachzuweisen.

Aus dem Harne der Tiere isolierte ich ein Kalisalz, das auf Grund seines Verhaltens als vanillinglykuronsaures Kali zu bezeichnen ist.

0,122 g Substanz: 0,049 SO_4K_2
Gefunden: K = 18,00 Proz.
Berechnet für $C_{14}H_{16}O_{11}K_2$: K = 17,80 Proz.

Durch Behandlung mit Emulsin konnte ich die Spaltung herbeiführen und Vanillinsäure vom Schmp. 207 gewinnen. Das Salz gab auch deutliche Pentosenreaktion.

Kotake, welcher unlängst das Baryumsalz der Glykuronvanillinsäure dargestellt und analysiert hat, nimmt auf Grund der von ihm gefundenen Werte an, daß die Paarung mit Glykuronsäure ohne Wasseraustritt erfolgt sei, daß also die Aldehydgruppe der Glykuronsäure zunächst ins Hydrat $CH(OH)_2$ verwandelt und das letztere unter Wasserabspaltung mit dem Alkohol

*) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 8, 513 (1875).

reagiert habe. Diese Auffassung rührt von Blum*) her, der in gleicher Weise die Zusammensetzung der von ihm dargestellten Dichlorthymolglykuronsäure auffaßt. Für das von mir gewonnene Thymotinpiperidid konnte ich zeigen, daß es ebenfalls durch Emulsin gespalten wird; man wird daher das gleiche für die Thymolglykuronsäure annehmen können. Es erscheint mir nicht ausgeschlossen, daß trotz der auch in einigen anderen Fällen scheinbar festgestellten Paarung ohne Wasseraustritt die glykosidische Struktur der gepaarten Verbindung auch dann wird angenommen werden müssen.

Das Zwischenprodukt der Oxydation des Coniferins im Organismus habe ich nicht fassen können, nämlich das Kalisalz der von Tiemann-Reimer**) dargestellten Glykovanillinsäure; diese erhielten sie bei der Oxydation des Coniferins mit Kaliumpermanganat, wobei also zuerst der aromatische Atomkomplex angegriffen wird; ein gleiches beobachteten sie beim Salicin. Man könnte sich vorstellen, daß auch im Organismus bei Einführung des Glykosids zuerst der aromatische Atomkomplex oxydiert wird, dann erst die Alkoholgruppe der Glykose zu COOH. Diese Vorstellung würde erklären, daß im Falle der Syringindarreichung das entsprechende Zwischenprodukt gefaßt werden konnte; der negative Ausfall im Falle des Coniferins könnte dahin erklärt werden, daß die Allylseitenkette des Coniferins schwerer vom Organismus angegriffen werde als die Propenylgruppe des Syringins, so daß im Falle des Coniferins länger das intakte Molekül im Organismus kreist als im Falle des Syringins. Wenn man sich vorstellt, daß beim Coniferin die Oxydation der Alkoholgruppe der Glykose und der Allylseitenkette zeitlich zusammenfällt, so könnte man in der Tat vergeblich das Zwischenprodukt suchen. Anders liegt die Sache im Falle des Syringins, wo im Organismus die Oxydation in erster Phase ganz wie außerhalb abläuft.

Bei seinen Untersuchungen über Safrol und Isosafrol hat Heffter festgestellt, daß das Verhalten im Stoffwechsel durch die abweichende Konstitution nicht beeinflußt wird, da in beiden Fällen Piperonylsäure als letztes Oxydationsprodukt gefunden wurde. In ihrem Verhalten gegen oxydierende Agentien haben sich allerdings Verschiedenheiten bei beiden Isomeren herausgestellt. Im Tierversuche zeigte sich nun, daß, während Safrol

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 514 (1892).
) Berichte d. deutsch. chem. Ges. **8, 515 (1875).

auffallende Verfettung erzeugte, diese Eigenschaft dem Isosafrol fehlte. Mir scheint diese Beobachtung immerhin darauf hinzudeuten, daß auch im Organismus die Oxydation der entsprechenden Seitenketten eine verschieden verlaufende sein dürfte.

Das im Falle des Syringins festgestellte Verhalten verleiht immerhin der Annahme von E. Fischer und Piloty einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit, daß bei der Paarung mit Glykuronsäure sich an die zu paarende Substanz zunächst Traubenzucker anlagert, dessen Alkoholgruppe sekundär in Karboxyl übergeht.

Kürzere Mitteilungen.

6. Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung.

Von Prof. Dr. **F. Obermayer** und Privatdozent Dr. **E. P. Pick.**

Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien
(Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf).

Mit Hilfe der überaus empfindlichen refraktometrischen Methode, über deren Verwendung zur Verfolgung der Fermentreaktion wir vorn ausführlich berichten*), haben wir versucht, zu ermitteln, welche Eiweißmengen das normale Serum aus präzipitierenden Immunseren auszufällen imstande ist. Der Versuch wurde derart angestellt, daß das Immunserum eines Kaninchens, das mit Menschenserum vorbehandelt war und eine sehr starke Fällung mit Menschenserum erzeugte, zu gleichen Teilen mit einem 10fach mit 0,85 proz. Kochsalzlösung verdünnten Menschenserum versetzt wurde. Die sich sofort trübende Lösung wurde 12 Stunden im Brutschrank wohl verschlossen stehen gelassen und die klare überstehende Flüssigkeit der refraktometrischen Untersuchung unterzogen.

Als Vergleichsprobe diente das Serum eines normalen Kaninchens, welches ebenfalls zu gleichen Teilen mit 10fach verdünntem Menschenserum gemischt worden war; außerdem wurden noch beide Kaninchensera für sich refraktometrisch verglichen. Die Ablesung erfolgte bei 24,9°.

Lösung.	Brechungswinkel	Brechungsindex
a) Normales Kaninchenserum und 0,85 proz. Kochsalzlösung	65° 47′	1,340103
b) Kaninchenimmunserum und 0,85 proz. Kochsalzlösung	65° 47′	1,340103
c) Normales Kaninchenserum und 10fach verdünntes Menschenserum	65° 45′	1,340265
d) Kaninchenimmunserum und 10fach verdünntes Menschenserum nach Abzentrifugieren des Präzipitats	65° 47	1,340103

Die Versuche zeigen, daß normales Kaninchenserum (Vergleichsserum) und das Kaninchenimmunserum denselben Brechungsindex besitzen, also miteinander ohne weiteres vergleichbar sind.

---

*) Diese Beiträge 7, 331.

Die Bestimmungen mit den Lösungen c) und d) ergeben, daß das Gemisch Kaninchenimmunserum-Menschenserum entsprechend dem durch die Immunreaktion ausgefallenen Präzipitat im Brechungsindex gegenüber der Kontrollprobe c) (Kaninchennormalserum-Menschenserum) 16,2 Einheiten der letzten Dezimalen eingebüßt hat.

Da der Ausschlag des Brechungsexponenten nach E. Reiß*) für 1 proz. Eiweiß 0,00175 beträgt, kann der durch die Immunreaktion ausgefallene Eiweißanteil nur einen sehr geringen Bruchteil eines Prozents betragen; auch Moll**) konnte durch Wägung aus 45 ccm eines kräftigen Immunserums durch spezifische Fällung einen Niederschlag von nur 0,0724 g erhalten.

7. Über den physiologischen Abbau der Säuren der Propanreihe.

Von Dr. **Riccardo Luzzatto,** Privatdozenten in Sassari.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg und dem pharmakologischen Institut zu Sassari.

Für die Erforschung der Gesetze, die das Schicksal und damit die pharmakologische Wirksamkeit chemischer Verbindungen im Tierkörper beherrschen, ist eine systematische Durchprüfung aller zugänglichen Verbindungen unerläßlich. Daher haben auch solche einschlägige Versuche einen Wert, die nicht gerade zu neuen Gesichtspunkten führen, aber doch eine Ergänzung des bereits Bekannten beibringen.

Von den Säuren der Propanreihe und ihren Abkömmlingen ist für die Propionsäure, die gewöhnliche Milchsäure, die Glycerinsäure (Pohl), Brenztraubensäure (Pohl), Malonsäure (Pohl), Tartronsäure (Pohl), Mesoxalsäure, ferner für α-Alanin (Langstein und Neuberg, Embden und Claus), β-Alanin (Steudel), Diaminopropionsäure (P. Mayer) nachgewiesen, daß sie im Organismus abgebaut werden, meist ohne zur Ausscheidung charakteristischer Derivate zu führen und zwar selbst nach Einführung größerer Mengen.

Ich habe dieser Reihe Erfahrungen über das Schicksal der Hydracrylsäure, (Äthylenmilchsäure, β-Oxypropionsäure), der β-Jodpropionsäure und der Acrylsäure zuzufügen.

Diese Säuren wurden an Hunde als Natronsalz verfüttert; der Harn wurde nach Einengen und Ansäuern auf unveränderte Säure, sowie auf die nächsten etwa zu erwartenden Abbauprodukte, z. B. Glycerinsäure, Oxalsäure, Brenztraubensäure, Essigsäure, Ameisensäure untersucht. Hydracrylsaures Natron wurde in Dosen bis zu 30 g, β-jodpropionsaures Natron bis zu Dosen von 5 g auf einmal gereicht. Es fanden sich keinerlei ätherlösliche saure Derivate; nur wurde einmal nach Hydracrylsäuredarreichung das Auftreten einer Säure in Spuren beobachtet, die sich wie Malonsäure verhielt. Das Jod der Jodpropionsäure kam als Jodid zur Ausscheidung.

*) E. Reiß, Eine neue Methode der quantitativen Eiweißbestimmung. Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **51**, 18.

) L. Moll, Über Blutveränderungen nach Eiweißinjektionen. Diese Beiträge **4, 578.

Auch bei Darreichung von Natriumacrylat konnte bei Dosen bis zu 1,5 g keine Ausscheidung von Derivaten desselben beobachtet werden. Doch erwiesen sich die Dosen von etwa 1 g an bereits als etwas toxisch und veranlaßten Inappetenz und Erbrechen. Es konnte dies mit Rücksicht auf das Verhalten der nah verwandten Krotonsäure nicht überraschen.

Doch verdient eine nebenher gemachte Beobachtung Erwähnung. Bei anhaltender Ätherextraktion des Harns im Apparat von Schacherl nach Acrylatzufuhr schieden sich bei dem ersten einschlägigen Versuche spärliche gefärbte Nädelchen im Äther aus, die sich hinterher fast nicht mehr in Äther lösten und sich bei näherer Untersuchung durch den Schmelzpunkt und die Jaffésche Reaktion als Kynurensäure erwiesen. Da bei dem mit Milch gefütterten Tiere vor der Acrylsäurezufuhr der Harn keine Kynurensäure an Äther abgegeben hatte, wurde der Versuch unter vergleichender Bestimmung der Stickstoffausscheidung wiederholt. Der Versuch erlitt insofern eine Störung, als die Zufuhr des Acrylats Erbrechen veranlaßte und die Nahrungsaufnahme (Milch) vorübergehend stark beeinträchtigte. Trotzdem zeigte die Hauptperiode gegen Vor- und Nachperiode eine auffällig erhöhte Stickstoffausscheidung, und wieder ergab sich, daß der Harn der Hauptperiode Kynurensäure enthielt, während jener der beiden anderen Perioden keine ausfallen ließ. Danach liegt es nahe, die gesteigerte Kynurensäurezufuhr auf eine toxische Vermehrung des Eiweißzerfalls zu beziehen. Ähnliches ist von L. B. Mendel und E. C. Schneider*) bei Phosphor- und Phlorizinvergiftung beobachtet worden.

---

8. Über die Wirkung des Ricins auf Lecithin.

Von Dr. **O. Pascucci** (Rom).

Bekanntlich hat das Ricin eine agglutinierende Wirkung auf die Blutscheiben. Bei Gelegenheit meiner Versuche über Hämolyse habe ich auf Vorschlag von Herrn Prof. Hofmeister auch die Wirkung des Ricins gegenüber den alkohol- und ätherlöslichen Bestandteilen des Blutscheibenstromas, Lecithin, Cholesterin und Cerebrin, untersucht. Ich teile nachfolgend ein Ergebnis dieser Versuche in Kürze mit, indem ich mir vorbehalte, später ausführlicher auf die Erscheinung einzugehen.

Stellt man sich eine Lecithinemulsion dar, indem man Lecithin in möglichst wenig Alkohol löst und dann viel physiologische Kochsalzlösung zufügt, und setzt der Emulsion tropfenweise eine Lösung von Ricin in der gleichen Kochsalzlösung zu, so wird das Lecithin in Form eines flockigen Niederschlags gefällt und läßt sich abfiltrieren. Bringt man dies Filtrat zur Blutscheibenemulsion, so kommt es sofort zur Hämolyse. Filtriert man dann, so bleiben die Stromata auf dem Filter, während das Hämoglobin ins Filtrat geht. Die ursprünglich rein agglutinierende Wirkung des Ricins wird somit durch den Lecithinzusatz anscheinend zu einer hämolytischen. Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, die mehrfach beobachteten Beziehungen zwischen Agglutination und Hämolyse quantitativ zu verfolgen. Cholesterin und Cerebrin haben keine solche Wirkung. Bemerkt sei noch, daß der durch Ricin aus einer Lecithinemulsion gefällte Niederschlag durch einen Überschuß von Ricin wieder in Suspension gebracht wird.

*) American Journal of Physiology 5, 427.

9. Zur Lehre von der Acetonbildung.

Von Dr. **G. Satta** (Ozieri).

Mit Bezug auf die Bemerkungen Waldvogels*) zu meinen „Studien über die Bedingungen der Acetonbildung“**) muß ich hervorheben, daß der von ihm beanstandete Satz: „Die von Waldvogel hervorgehobene Erscheinung darf einstweilen nicht von dem Unterschied der Konstitution der verschiedenen Kohlehydratsorten abgeleitet werden“ u. s. w. nicht gegen Waldvogel gerichtet war, sondern nur gegen die Möglichkeit einer solchen Erklärungsweise ganz im allgemeinen.

Auf die übrigen von Waldvogel geäußerten Bedenken näher einzugehen, scheint mir zur Zeit verfrüht. Die Existenz einer toxischen Fetteinschmelzung harrt noch ihres experimentellen Nachweises, und auch die Erörterung der Frage, ob subkutan eingebrachte Glykose die Acetonbildung hemmt, wie ich gezeigt zu haben glaube, oder nicht, dürfte besser einem Zeitpunkt vorbehalten bleiben, wo weitere einschlägige Erfahrungen vorliegen.

*) Diese Beiträge 7, 150.
**) Diese Beiträge 6, 376.

A. W. ZICKFELDT, OSTERWIECK/HARZ

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

VII. Band. 10. u. 11. Heft
(Ausgegeben Dezember 1905)

Braunschweig
Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1905.

Inhalt des 10. u. 11. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40.— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXV.

Zur Lehre vom Harnsäurestoffwechsel.

Erste Mitteilung.

Über die Zersetzung der Harnsäure durch die Organe des Säugetiers.

Von Dr. **Marco Almagia** (Rom).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Aus einer Mitteilung von Lauder Brunton*) geht hervor, daß Stokvis schon im Jahre 1860 die harnsäurespaltende Wirkung von Organbrei beobachtet hat. Später haben Brunton und Bokenham**) gefunden, daß die zerkleinerte Leber verdauender Tiere die Harnsäure unter Harnstoffbildung zerlegt, nicht aber die Leber nüchterner Tiere. Neuere Beobachtungen von Chassevant und Richet***), von Ascoli†) und von Wiener††) haben gelehrt, daß die Fähigkeit der Organe, Harnsäure zu zerlegen, bei derselben Tierart eine ungleiche ist, und daß sich selbst dasselbe Organ bei verschiedenen Tierarten in dieser Richtung verschieden verhält, indem z. B. die Leber von Hund und Schwein die Harnsäure zerlegt, die Kalbsleber dagegen Harnsäure aufbaut. Nach Wiener wird die Harnsäure auch von den Nieren zerlegt, am schwächsten von den Muskeln.

Schittenhelm†††) beobachtete, daß die Kalbsleber Harnsäure bildet, bemerkte aber, daß sie zugleich Harnsäure zerstört. Von allen Organen besitzt ihm zufolge die Niere das stärkste Vermögen, Harnsäure zu zerlegen, ihr zunächst die Leber, dann folgen die Muskeln und vielleicht das Knochenmark.

---

*) Centralbl. f. Physiologie **19**, 5 (1905).
**) Arch. des scienc. biol. St. Petersbourg. 1904. Suppl.
***) Compt. rend. soc. biol. **49**.
†) Pflügers Archiv **72**.
††) Archiv f. exper. Path. u. Pharm. **42**.
†††) Zeitschr. f. physiol. Chemie **42**, 251.

Auf Vorschlag von Hrn. Prof. Hofmeister habe ich den Abbau der Harnsäure durch Organbrei neuerdings planmäßig untersucht.

Ich benutzte ausschließlich Organe vom Pferde, die ich 4 bis 5 Stunden nach dem Schlachten erhielt. Vom Brei der fein zerkleinerten Organe wurden bestimmte Portionen abgewogen und mit gemessenen Mengen einer Lösung von Natriumurat von bekanntem Gehalt zusammengebracht. Um Fäulnis zu verhüten, wurde zumeist Toluol zugefügt, das Gemenge anhaltend geschüttelt, dann in verschlossenem Gefäße ungleich lange Zeit bei 37° gehalten. Zuletzt wurde filtriert, enteiweißt und im Filtrat die Harnsäure nach dem Verfahren von Ludwig-Salkowski durch Doppelanalysen ermittelt.

Ich beobachtete dabei ein Verhalten, das einer weiteren Untersuchung wert erscheint. In Kontrollversuchen, wo ich Harnsäure in alkalischer Lösung verschieden lange bei 37° stehen ließ, erhielt ich, falls ich einen Überschuß von Alkali zugefügt hatte, bald eine mehr oder weniger deutliche Glyoxylsäurereaktion mit Indol und konzentrierter Schwefelsäure*). Daß die Harnsäure in alkalischer Lösung rasch der Spaltung unterliegt, ist bekannt. Es liegt nahe, anzunehmen, daß eines der Spaltungsprodukte Allantoin ist, das, wie Eppinger gefunden hat, schon nach Erhitzen mit Alkali Glyoxylsäurereaktion gibt. Beim Kochen von Harnsäure mit Natronlauge, Natriumkarbonat oder Ammoniak tritt, wie ich gefunden habe, die gleiche Erscheinung ein. Der Abbau der Harnsäure durch Alkali erfolgt sonach, wenigstens zum Teil, über die Glyoxylsäure und es liegt nahe zu fragen, ob nicht auch der Abbau durch die Organe auf gleichem Wege zustande kommt. Ich glaube diese Frage bejahen zu müssen. Wenigstens habe ich die Glyoxylsäurereaktion in vielen Versuchen positiv gefunden, wo eine nicht alkalisch reagierende Harnsäurelösung mit Organbrei zusammengebracht worden war.**) Ebenso habe ich bei Kaninchen, deren Harn vorher keine Glyoxylsäurereaktion darbot, nach intraperitonealer Injektion von erheblichen Mengen Harnsäure (2 bis 5 g) die Reaktion auftreten sehen. Dabei sei bemerkt, daß es mir gelang, im Harn eines Gichtikers, ohne daß gerade ein Anfall vorangegangen war, wiederholt Glyoxylsäurereaktion zu erhalten, während sie sonst im Menschenharn, abgesehen von Alkoholgenuß***), jedenfalls sehr selten ist.

*) Eppinger, Diese Beiträge **6**, 492 und Inada, Diese Beiträge **7**, 473.

**) Solche nicht alkalische Harnsäurelösungen geben an sich beim Stehen keine Glyoxylsäurereaktion.

***) Eppinger, Diese Beiträge **6**, 489.

Nachstehend gebe ich meine Resultate tabellarisch wieder:

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Verwendet	g (ccm)	Gehalt der zugesetzten Harnsäurelösung %	Dauer der Einwirkung Tage	Abnahme des Gehalts d. Harnsäurelösung %	Zersetzt durch 100 g Organ g Ur	Bemerkungen
I	1	Leberbrei	3 g	0,021	12	0,014	0,466	Mit Toluolzusatz
	2	„	3 „	„	„	0,016	0,532	Ohne „
	3	Muskelbrei	3 „	„	„	0,008	0,266	Mit „
	4	„	3 „	„	„	0,008	0,266	Ohne „
II	1	Leberbrei	5 g	0,042	5	0,037	0,740	Die Reaktion der Flüssigkeit, im Beginn alkalisch, schlägt bei II 1 (Leber) in sauer um.
	2	Nierenbrei	5 „	„	„	0,038	0,756	
	3	Muskelbrei	5 „	„	„	0,035	0,700	
III	1	Preßsaft v. Milz	25 ccm	0,075	8	0,050	0,200	
	2	„ von Lymphdrüsen	10 „	„	„	0,052	0,520	
	3	Preßsaft von Pankreas	50 „	„	„	0,012	0,024	
	4	Preßsaft von Schilddrüse	25 „	„	„	0,033	0,132	
IV	1	Blutleukocyten	8 g	0,06	4	0,045	0,562	In der Probe mit Leukocyten die Glyoxylsäurereaktion nach 24 Stunden positiv, während sie in den anderen Proben fehlt.
	2	Knochenmark	15 „	„	„	0,043	0,287	
	3	Preßsaft von Pankreas	50 ccm	„	„	0,025	0,050	
	4	Lymphdrüsenbrei	7 g	„	„	0,013	0,186	
	5	„	10 „	„	„	0,057	0,570	
V	1	Lymphdrüsenbrei	5 g	0,082	$1^1/_2$	0,034	0,680	Die Glyoxylsäurereaktion ist nach 36 Stunden deutlich im Lymphdrüsenbrei, schwach im Leberbrei; sie fehlt in den übrigen Proben.
	2	Leberbrei	5 „	„	„	0,033	0,660	
	3	Nierenbrei	5 „	„	„	0,029	0,480	
	4	Muskelbrei	5 „	„	„	0,012	0,240	

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Verwendet	g (ccm)	Gehalt der zugesetzten Harnsäurelösung %	Dauer der Einwirkung Tage	Zunahme des Gehalts d. Harnsäurelösung %	Gebildet von 100 g Organ g Ur	Bemerkungen
VI	1	Gehirnbrei	3 g	0,021	12	0,010	0,333	Die Reaktion des Gehirnbreis, die im Beginn schwach alkalisch war, geht zum Schluß in sauer über.
	2	„	5 „	0,082	$1^1/_2$	0,006	0,120	
	3	Pankreasbrei	5 „	0,082	„	0,014	0,280	

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Vermögen, Harnsäure zu zersetzen, in den Organen des Pferdes sehr verbreitet ist. Es ist anscheinend am stärksten entwickelt bei der Leber, dann folgen in absteigender Reihe Niere, Lymphdrüsen, Leukocyten, Muskeln, Knochenmark, Milz, Schilddrüse. Andere Organe,

Gehirn und Pankreas, zeigen unter gleichen Bedingungen Harnsäurevermehrung. Da Pankreaspreßsaft bei langdauernder Einwirkung (III, 3) eine Verminderung der Harnsäure bewirkte, so scheint es, daß hier, wie auch Schittenhelm annimmt, zwei einander entgegengesetzte Prozesse verlaufen, wobei in der ersten Zeit die Produktion, später die Zerstörung der Harnsäure überwiegen mag. Vielleicht gilt ähnliches auch für die anderen Organe, so daß die gefundenen Werte nur ein Maß für das Überwiegen des Harnsäureabbaues geben. Ferner geht namentlich aus Versuchsreihe III und IV hervor, daß der Organbrei im Verhältnis ungleich wirksamer ist als der nahezu zellenfreie Preßsaft. Die Unwirksamkeit zellenfreier Extrakte ist bereits von Wiener hervorgehoben worden. Darnach ist das die Harnsäure zerstörende Agens derart an die geformten Elemente gebunden, daß es sich von ihnen auch mit der Buchnerschen Presse nicht trennen läßt.

Das Auftreten der Glyoxylsäure, soweit es sich mit Hilfe der Indol-Schwefelsäurereaktion verfolgen läßt, scheint an einen erheblichen Harnsäurezerfall geknüpft zu sein. Doch wurde es am frühesten in den Versuchen mit Leukocyten und Lymphdrüsen festgestellt, obgleich diese in ihrem Vermögen Harnsäure zu zerlegen nicht an allererster Stelle stehen. Es besteht darnach zwischen der Harnsäurezerstörung in den einzelnen Organen anscheinend nicht bloß ein quantitativer, sondern auch ein qualitativer Unterschied. Vermutlich sind bei dem Harnsäureabbau mehrere Agentien — oxydative und spaltende — beteiligt, die in den einzelnen Organen nicht in gleichem Maße zur Wirkung gelangen. Dadurch, sowie durch die nebenhergehende Bildung der Harnsäure aus ihren Vorstufen wird ein Einblick in die zugrunde liegenden Vorgänge sehr erschwert. Von der getrennten Untersuchung der einzelnen am Harnsäureabbau beteiligten Faktoren ist wohl am ehesten Aufklärung zu erwarten. Ich habe mich daher zunächst der Isolierung der beteiligten Fermente zugewendet und hoffe darüber bald näheres berichten zu können.

XXVI.

Zur Lehre vom Harnsäurestoffwechsel.

Zweite Mitteilung.

Über die Zersetzung der Harnsäure durch menschliches Nierengewebe.

Von Dr. **Wilhelm Pfeiffer** (Kiel).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Im Anschluß an die Untersuchungen Wieners über Zersetzung und Bildung der Harnsäure im Tierkörper*) unternahm ich es im Winter 1903/04, den Einfluß der Menschenniere auf zugesetzte Harnsäurelösung zu studieren.

Wiener hat uns als Organe, in denen eine Zersetzung der Harnsäure überhaupt vor sich geht, die Hunde- und Schweineleber, die Rinder- und Pferdeniere und den Rindermuskel kennen gelehrt, während in seinen Versuchen Hundeniere Harnsäure nicht oder kaum zerstörte. Im Gegensatz dazu ergab sich für die Rinderleber, Rindermilz und Rinderthymus sogar Harnsäurebildung. Wiener bewies ferner, daß diese Harnsäurezersetzung nicht ein rein passiver Vorgang ist, sondern daß sie in irgend einer Weise an das Leben oder an partielles Überleben der Nierenelemente gebunden ist und mit dem vollständigen Tode derselben schwindet. Er nimmt an, daß schon normaler Weise im Organismus viel mehr Harnsäure gebildet als ausgeschieden wird, und daß wir nur jenen Anteil im Harn wiederfinden, welcher der Zersetzung, sei es in den Nieren oder in anderen Organen, entgangen ist. Es braucht daher bei einer Erkrankung, die mit einer vermehrten Harnsäureausscheidung und mit einer Vermehrung der Harnsäure in den Geweben und im Blute einhergeht, gar keine vermehrte Harnsäureproduktion vorhanden zu sein; es kann sich vielmehr in diesen Fällen lediglich um eine Störung der nachträglichen Harnsäurezersetzung handeln.

---

*) Wiener, Archiv f. exper. Path. u. Pharm. **42**, 375 ff.

Datum	Versuchs-nummer	Nierenbrei g	physiol. + Kochsalz-lösung*) ccm	Wie viele Stunden nach dem Tode in Arbeit genommen	Kolatur ccm	Zusatz g Harnsäure	Zeit der Einwirkung	Menge der gefundenen Harnsäure	Wieviel Harnsäure zerstört Proz.
10. XI. 03	1	210 Schweine-niere	700	sofort	200	0,1377	4 Stunden	0,0585	57
19. XI. 03	2	212 Schweine-niere	700	sofort	200	0	4 Stunden	0,0114	—
					200	0,1446	"	0,0669	54
					200	0,1362	"	0,0727	47
3. XII. 03	3	490 Schweine-niere	1400	sofort	je 200	0	0	a) 0,00399	—
								b) 0,00483	—
					je 200	0	4 Stunden	a) 0,00609	—
								b) 0,00315	—
					200	0,1372	"	0,00525	96
					200	0,1476	"	0,00273	98
10. II. 04	4	280 Menschen-niere	800	12	200	0	0	0,00441	—
					200	0	4 Stunden	0,00441	—
					200	0,1375	"	0,00399	97
					200	0,1387	"	0,01155	92
3. III. 04	5	170 Menschen-niere	400	15	100	0	0	0,00273	—
					100	0	4 Stunden	0,00231	—
					100	0,1407	"	0,00693	95
					100	0,1414	"	0,00315	98

*) Dieselbe enthielt zur Verhütung jeder Fäulnis 2 g Fluornatrium auf 1 Liter.

Mit Rücksicht auf die immer noch unklare Pathogenese der Gicht schien es mir besonders wichtig, auf das Verhalten der menschlichen Niere zugesetzter Harnsäure gegenüber näher einzugehen.

Ehe ich zu den Untersuchungen menschlicher Nieren überging, untersuchte ich das Verhalten von Schweinenieren, von der Überlegung ausgehend, daß die Schweine als Omnivoren in betreff der Zusammensetzung der Nahrung eine ähnliche Ausnahmestellung einnehmen, wie der Mensch.

Auch ich verwandte wie Wiener nicht die intakten überlebenden Organe, sondern ließ eine Kolatur des Organbreies auf eine Harnsäurelösung einwirken.

Die Versuchsanordnung und die Bestimmung der Harnsäure geschah genau nach der von Wiener ausführlich gegebenen Vorschrift.*)

Die Schweinenieren wurden noch warm — wie sie aus dem Schlachthause gebracht wurden — verarbeitet. Die Menschennieren, welche ich der Freundlichkeit des Herrn Professor v. Recklinghausen verdanke, konnten naturgemäß aus äußeren Gründen erst einige Zeit nach dem Tode untersucht werden. Die beiden Individuen, deren Nieren mir zur Verfügung standen, hatten weder an einer Nieren-, noch an einer Stoffwechselkrankheit gelitten.

Ich gebe vorstehend eine Tabelle meiner Versuchsergebnisse.

Es ergaben diese Untersuchungen ein recht beträchtliches Harnsäurezersetzungsvermögen für Schweinenieren sowohl als auch für Menschennieren. Es findet sich hier also eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen Wieners bei Pflanzenfressern (Rind und Pferd). Dort betragen die Prozentzahlen für zerstörte Harnsäure zwischen 80 und 98 Proz. Ein ganz abweichendes Verhalten zeigt nur die Hundeniere, welche Harnsäure nur in geringem Maße zersetzt (zwischen 14 und 19 Proz.).

Inwieweit und ob hier neben der Harnsäurezerstörung eine Harnsäurebildung einhergeht und ob bald die eine bald die andere überwiegt und sich dadurch die anscheinend so differenten Werte ergeben, muß ich dahingestellt sein lassen. Für die Rinderleber scheint ein solcher Vorgang in der Tat durch die Untersuchungen Wieners erwiesen.**)

*) loc. cit. S. 381 u. 382.
**) loc. cit. S. 394.

XXVII.

Zur Lehre vom Harnsäurestoffwechsel.

Dritte Mitteilung.

Über das Absorptionsvermögen der Knorpelsubstanz für Harnsäure.

Von Dr. **Marco Almagia** (Rom).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Unter den örtlichen Erscheinungen der Gicht ist die Ablagerung von Uraten vor allem im Hyalin- und Faserknorpel, dann aber auch in den Sehnen, dem intermuskulären und subkutanen Bindegewebe, in den Nieren und manchmal auch in anderen Organen besonders auffällig und wichtig. Die Bevorzugung der Knorpelsubstanz, namentlich bestimmter Gelenkknorpel, ist trotz aller bereits ausgesprochenen Hypothesen zur Zeit ebenso unverständlich wie vor 25 Jahren, da Cohnheim*) die Sachlage mit den Worten zusammenfaßte: „Weshalb aber die Ablagerungen der Urate gerade in die Gelenke und unter diesen mit so seltsamer Vorliebe in das Metatarso-Phalangealgelenk der großen Zehe geschehen, dafür fehlt uns, wenn wir ehrlich sein wollen, jedes Verständnis."

Jedenfalls ist es wünschenswert, festzustellen, ob die besondere nähere Beziehung zwischen Knorpelsubstanz und Uraten als eine normale oder als eine pathologische, der Gicht spezifisch zukommende Erscheinung zu betrachten ist. Ich habe daher auf Wunsch von Herrn Prof. Hofmeister untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die normale Knorpelsubstanz die Fähigkeit hat, harnsaure Salze aufzunehmen und abzulagern.

Die Methodik gestaltete sich überaus einfach. Ich brachte dünne Knorpelschnitte, bzw. andere Gewebe, in möglichst neutrale Lösungen von Natriumurat, deren Gehalt genau bekannt war,

*) Vorlesungen über allgemeine Pathologie 2, 287.

beließ sie darin verschieden lange und bestimmte dann neuerdings den Gehalt der Lösung an Harnsäure. Aus den erhaltenen Zahlen war ohne weiteres zu entnehmen, ob eine nennenswerte Aufnahme von Harnsäure von seiten des Knorpels usw. stattgefunden hatte oder nicht.

Ich benutzte in meinen Versuchen Knorpel und Gewebe von eben geschlachteten Pferden. Die Verwendung gegen Lackmus neutral oder höchstens schwach alkalisch reagierender Uratlösungen ist durch den Umstand geboten, daß in stärker alkalisch reagierenden Lösungen, wie ich mich durch Vorversuche überzeugte, die Harnsäuremenge allmählich abnimmt.

Nachstehend teile ich zunächst das Ergebnis meiner Versuche mit.

Versuchsreihe I.

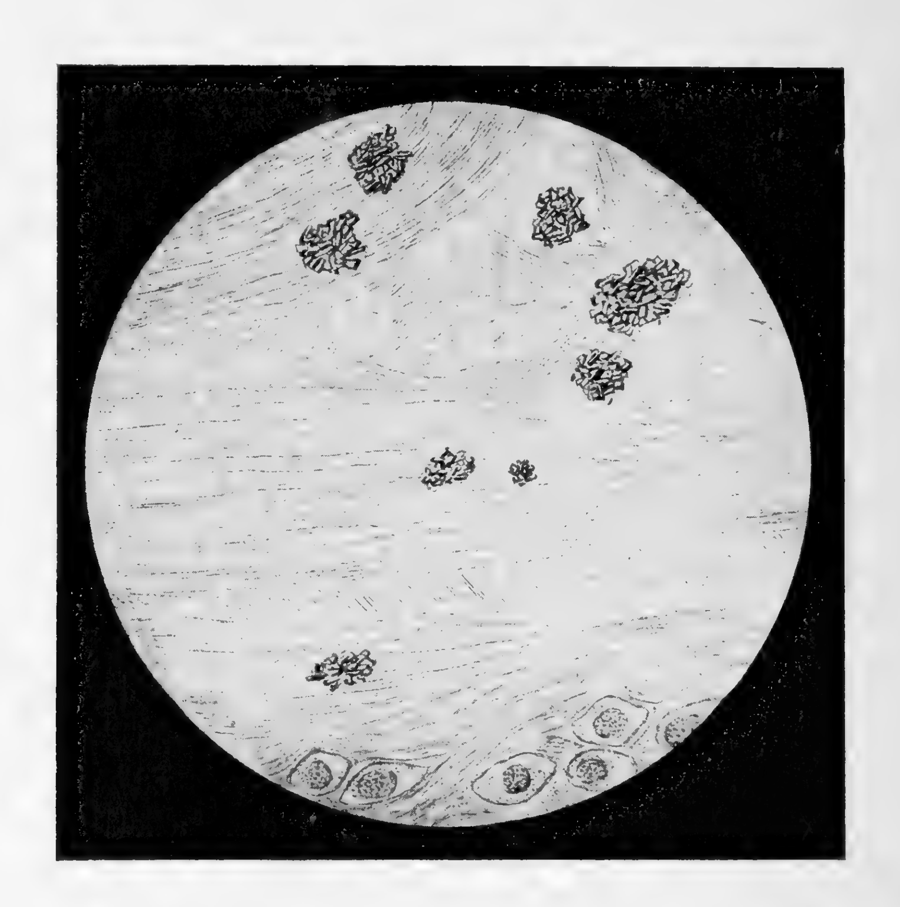
Versuch Nr.	Uratlösung ccm	Gelenkknorpel g	Temperatur	Dauer der Digestion Tage	Gehalt d. Ausgangslösung % $\overline{Ur}$	Abnahme d. Gehalts % $\overline{Ur}$	Abnahme auf 100 g Knorpel g $\overline{Ur}$
1	100	20	37°	2	0,034	0,011	0,055
2	40	2	„	6	0,038	0,017	0,340
3	20	3	„	13	0,021	0,012	0,080

Es hatte somit in allen Versuchen eine erhebliche Abnahme des Harnsäuregehaltes stattgefunden. Sie konnte durch eine vom Knorpel veranlaßte Veränderung der Harnsäure oder eine Aufnahme seitens des Knorpels bedingt sein. Die einfache Betrachtung der längere Zeit in der Uratlösung gehaltenen Knorpelstücke (Versuch 2 und 3) lehrte, daß sicher eine Absorption vorlag. Die sonst gleichmäßig durchscheinenden Knorpellamellen zeigten nämlich schon makroskopisch weiße, in die Tiefe dringende Flecken und Trübungen, die an Harnsäureablagerungen in den Knorpeln von Gichtkranken erinnerten. Diese Flecken waren weder durch Waschen mit Wasser noch durch Scheuern der Oberfläche zu entfernen. Sie bestanden, wie die mikroskopische Untersuchung von Querschnitten lehrte, aus in das Knorpelgewebe eingelagerten mehr oder weniger deutlich kristallinischen Massen. Die deutlicher ausgebildeten Kristalle zeigten Prismenformen. (Siehe Figur auf S. 468.)

Um welches Urat es sich handelte, ist zunächst nicht zu entscheiden. Daß aber die abgelagerten Massen sich im Innern des Knorpelgewebes finden, geht nicht bloß aus dem Gesagten, sondern weiter auch aus folgendem hervor.

Wurden die Knorpelstücke so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser auch nicht eine Spur von Murexid-

reaktion mehr gab, und nun für einige Minuten in kochendes Wasser gebracht, so gab der Auszug nach dem Einengen wieder positive Murexidreaktion.



Die Knorpelsubstanz besitzt sonach das Vermögen, aus sehr verdünnten Lösungen von harnsaurem Natron sehr erhebliche Mengen von Urat aufzunehmen und in kristallinischer Form abzulagern. Hingegen scheint dem Knorpel, im Gegensatz zu vielen anderen Geweben, das Vermögen zu fehlen, die Harnsäure abzubauen.

Bei der Aufnahme von Urat durch den Knorpel sind zwei Teilvorgänge zu unterscheiden: 1. Die Absorption der Urate, die mit der Aufnahme von kristalloiden und kolloiden Stoffen durch Kolloide in eine Reihe zu stellen ist*). 2. Das Auskristallisieren der aufgenommenen Urate, das einerseits die Aufnahme weiterer Uratmengen ermöglicht, andererseits geeignet ist, die normale Beschaffenheit des Knorpelgewebes mechanisch zu zerstören.

*) Vgl. K. Meyer, Diese Beiträge 7, 393.

Mit Rücksicht auf den Umstand, daß die Kristallisation bekanntlich sehr oft durch niedrige Temperaturen ausgelöst wird, daß ferner die Knorpel, die bei der Gicht am häufigsten erkranken, die Gelenkknorpel der Füße und Hände, die Ohrknorpel usw., gerade diejenigen sind, die langdauernder Abkühlung (dem Erfrieren) am häufigsten ausgesetzt sind, habe ich untersucht, ob die Temperatur der Digestion auf die Absorption und Kristallisation der Harnsäure einen besonderen Einfluß hat.

Versuchsreihe II.

Versuch Nr.	Uratlösung ccm	Gelenkknorpel g	Temperatur	Dauer der Digestion Tage	Gehalt d. Ausgangslösung % Ūr	Abnahme d. Gehalts % Ūr	Abnahme auf 100 g Knorpel g Ūr
1	50	5	37°	4	0,0294	0,021	0,210
2	„	„	„	„	„	0,021	0,210
3	„	„	6°	„	„	0,008	0,080
4	„	„	„	„	„	0,006	0,060

In Versuch 1 und 3 war die Lösung neutral, in 2 und 4 schwach alkalisch.

Wie ersichtlich, ist bei 6° die Menge der absorbierten Harnsäure sehr viel geringer als bei 37°. Ob das Absorptionsvermögen bei niederer Temperatur überhaupt geringer ist, oder bloß eine Verzögerung der Aufnahme vorliegt, ist nicht zu entnehmen. Eine herdweise Ablagerung und Kristallisation im Knorpel fehlte in diesem Versuche durchaus, was freilich im Hinblick auf die niedrige Konzentration der Ausgangslösung nicht befremden kann. Ein Einfluß der Reaktion innerhalb der angegebenen Grenzen ist nicht wahrnehmbar. Um sicherzustellen, ob in der Tat die Konzentration einen Einfluß auf die Kristallisation hat, wurde der Versuch mit einer konzentrierteren Harnsäurelösung wiederholt.

Versuchsreihe III.

Versuch Nr.	Uratlösung ccm	Gelenkknorpel g	Temperatur	Dauer der Digestion Tage	Gehalt d Ausgangslösung %	Abnahme d. Gehalts %	Abnahme auf 100 g Knorpel g
1	50	5	37°	5	0,042	0,035	0,35
2	„	„	6°	„	„	0,025	0,25

Die Proben unter Toluolzusatz.

Obgleich auch in dieser Versuchsreihe die bei niederer Temperatur gehaltenen Knorpelstücke eine geringere Uratmenge absorbiert hatten, so ist doch, wohl wegen der höheren Konzentration der Ausgangslösung, vielleicht auch wegen der etwas

längeren Versuchsdauer, der Einfluß der Temperaturdifferenz weniger merklich. Auch war in beiden Versuchen eine kristallinische Abscheidung in der Knorpelsubstanz erfolgt.

Die bisher angeführten Versuche waren sämtlich mit Gelenkknorpel als dem vom Gesichtspunkte der Gicht nächstliegenden Objekte angestellt. Es war nun festzustellen. ob andere Knorpel und vielleicht andere Arten von Bindesubstanz das gleiche Verhalten zeigen. Ich berichte vorläufig über eine mit dem Knorpel der Nasenscheidewand, des Kehlkopfes und mit Sehnen, sämtlich vom Pferde, angestellte Versuchsreihe.

Versuchsreihe IV.

Versuch Nr.	Uratlösung ccm	Gewebe g	Temperatur	Dauer der Digestion Tage	Gehalt d. Ausgangslösung % Ur	Abnahme d. Gehalts % Ur	Abnahme auf 100 g Gewebe g Ur
1	30	Nasenscheidewand-Knorpel 5 g	37°	7	0,062	0,037	0,222
2	30	Kehlkopf-Knorpel 5 g	„	„	0,062	0,034	0,204
3	20	Sehnen 3 g	„	„	0,021	0,0105	0,070
4	50	Sehnen 5 g	„	„	0,042	0,035	0,350

Alle Proben mit Toluolzusatz.

Obgleich in diesem Fall von Knorpeln und Sehnen in etwa gleichem Maße wie sonst Urat aufgenommen worden war, fehlte doch die kristallinische Ablagerung. Doch gaben die gewaschenen Gewebestücke beim Ausziehen mit heißem Wasser die Murexidprobe.

Betrachtet man die Zahlen der letzten Spalte in den mitgeteilten Tabellen, so sieht man, daß die Menge der vom Knorpel nach einigen Tagen bei Körpertemperatur aufgenommenen Harnsäure so groß ist, daß der Prozentgehalt der Knorpelsubstanz daran zum Schluß jenen der zurückgebliebenen Harnsäurelösung um das 8- bis 50fache übersteigt. Es liegt nahe, anzunehmen, daß die Absorption der Urate seitens des Knorpels nach dem Verteilungssatz erfolgt, da aber die aufgenommenen Urate nachträglich im Knorpel auskristallisieren, kann bei der vorliegenden Versuchsanordnung der Verteilungsfaktor nicht scharf ermittelt werden. Auch wurden die Versuche nicht bis zur Erreichung einer maximalen Absorption fortgesetzt. Immerhin hat es ein Interesse, jene Versuche von längerer Dauer und 37° Temperatur, wo eine Uratkristallisation ausgeblieben war, nach dieser Richtung zu vergleichen.

Versuchs-reihe	Versuch Nr.	a) Konzentration der Uratlösung am Ende des Versuchs	b) Konzentration der Knorpelsubstanz am Ende des Versuchs	$\frac{b}{a}$
II	1	0,0084	0,21	25
II	2	0,0084	0,21	25
IV	1	0,025	0,222	9
IV	2	0,028	0,204	8

Eine andere Möglichkeit wäre die, daß die Urate mit Bestandteilen der Knorpelsubstanz chemische Umsetzungen oder Verbindungen eingehen. Das wäre durch weitere Versuche festzustellen.

Daß die Kristallisation der Urate in der Knorpelsubstanz das eine Mal auftrat, das andere Mal trotz anscheinend gleicher Bedingungen ausblieb, wird niemand Wunder nehmen, der Gelegenheit gehabt hat zu sehen, wie minimale, oft nicht sicherzustellende Einwirkungen auf den Eintritt der Kristallabscheidung in Lösungsgemengen von Einfluß sind. Daß die Temperatur hier nicht, wenigstens nicht allein, entscheidet, konnte eben gezeigt werden. Den Einfluß der mechanischen Erschütterung, die eines der wirksamsten Mittel zur Auslösung der Kristallisation ist, habe ich noch nicht untersucht.

Die mitgeteilten Tatsachen führen zu der Vorstellung, daß die besondere Beziehung, die bei der Gicht zwischen Uraten und Knorpelsubstanz zu bestehen scheint, in einem besonders hohen physikalischen oder chemischen Absorptionsvermögen der Knorpelsubstanz für Urate besteht, bei gleichzeitigem Unvermögen derselben, die Harnsäure zu zerlegen, sie lehren aber zugleich, daß diese besondere Beziehung nicht dem Gichtprozeß als solchem zukommt, sondern eine normale Erscheinung ist. Ich bin in der Lage, die entwickelte Vorstellung von der Prädilektion der Knorpelsubstanz für Urate durch einen weiteren Versuch zu belegen.

Ich injizierte Kaninchen in die Peritonealhöhle erhebliche Mengen Harnsäure, tötete die Tiere nach einigen Tagen oder wartete deren Verenden ab, das meist nach Einbringung von 5 bis 7 g eintrat, und untersuchte dann mittels der Murexidreaktion verschiedene Gewebe auf Harnsäure. Die Reaktion war in den Gelenkknorpeln fast immer positiv, während sie in der Leber, Milz, den Muskeln und Lungen fehlte, obgleich sich regelmäßig ein großer Teil der injizierten Harnsäure noch in der Bauchhöhle abgekapselt nachweisen ließ.

Wenn es gestattet ist, aus dem Mitgeteilten einen Schluß auf die Pathologie der Gicht zu ziehen, so darf die Anhäufung von

Uraten im Knorpel des Gichtkranken als der Ausdruck eines vorübergehend oder dauernd erhöhten Uratgehaltes der Gewebesäfte aufgefaßt werden, was ja mit den bekannten Tatsachen in guter Übereinstimmung steht.

Da dem Knorpel ein lebhafterer Flüssigkeitsaustausch und, so viel sich beurteilen läßt, auch die Fähigkeit abgeht, die aufgenommene Harnsäure zu zerlegen, so kann diese nur sehr langsam aus dem Knorpel verschwinden.

Es liegt ferner nahe, anzunehmen, daß die absorbierten Urate zunächst in gelöster Form vorhanden sind, daß aber diese anscheinend oft übersättigte Lösung durch äußere Einwirkungen, z. B. mechanische Erschütterung (wofür direkt klinische Erfahrungen sprechen), durch andauernde Temperaturherabsetzung, oder durch Bildung stärker saurer Salze, oder endlich durch andere noch völlig unbekannte Anlässe zur Kristallisation gebracht werden kann, und daß die durch die Kristallbildung gesetzte mechanische Zerstörung — man denke an die analogen Vorgänge beim Erfrieren der Pflanzen — den Ausgangspunkt der gichtischen Nekrose und Entzündung bildet.

Diese und ähnliche Vorstellungen, von denen ausgehend mir Herr Prof. Hofmeister die Aufnahme der vorliegenden Untersuchung empfahl, sind wenigstens innerhalb gewisser Grenzen einer experimentellen Prüfung zugänglich, und es kann eine ausführlichere Darlegung so lange unterbleiben, bis die einschlägigen, bereits im Gang befindlichen Versuche zum Abschluß gediehen sind.

XXVIII.

Über den Nachweis der Glyoxylsäure im Harn.

Von Dr. **Ryokichi Inada** (Fukuoka, Japan).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Während Hopkins die Reaktion zwischen Glyoxylsäure und Indol bei Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure zum Nachweis von Indol- und Skatolgruppen im Eiweiß benutzen lehrte, hat Eppinger*) die Reaktion umgekehrt zur Auffindung von Glyoxylsäure benutzt. Ihm zufolge kommt Glyoxylsäure unter Umständen auch im Harn vor. Die Bedeutung dieses Vorkommens ist nach seinen und anderen im hiesigen Institut gemachten Erfahrungen in folgendem zu suchen:

1. Die Glyoxylsäure kann als Produkt der unvollkommenen Oxydation von Aethanderivaten und anderen Fettkörpern, z. B. Alkohol, im Harn auftreten.

2. Sie stellt ein Produkt des Harnsäureabbaues dar. Wenn man Allantoin mit Alkali kocht, so bildet sich nach Eppinger Glyoxylsäure. Das gleiche hat Almagia**) bei Einwirkung von Alkali auf Harnsäure beobachtet. Daß die Harnsäure auch im Tierkörper in gleichem Sinne abgebaut wird, geht aus dem Auftreten von Glyoxylsäure im Harne von Kaninchen nach intraperitonealer Injektion von Harnsäure (Almagia), sowie aus ihrem Vorkommen im Harn bei Gicht (Almagia) mit großer Wahrscheinlichkeit hervor.

3. Sie kann, in größerer Menge eingeführt, nach Eppingers Erfahrungen zu vermehrter Ausscheidung von Oxalsäure und Allantoin Veranlassung geben. Ihr Vorkommen im Harn kann daher als Hinweis auf Bestehen oder Eintreten von Oxalurie dienen.

Bei der Bequemlichkeit, mit der sich die Glyoxylsäure-Indolreaktion ausführen läßt, und wegen ihrer außerordentlichen Empfind-

*) Diese Beiträge 6, 489.

**) Vgl. diese Beiträge 7, 460.

lichkeit — Eppinger vermochte damit noch 0,00005 g in 1 ccm Lösung nachzuweisen — ist zu erwarten, daß sie vielfach klinische Verwendung finden wird. Um so notwendiger ist es, die dieser Probe anhaftenden Fehlerquellen zu kennen.

Schon Eppinger fiel es auf, daß der Harn von Pflanzenfressern (Kaninchen und Meerschweinchen) die Reaktion recht häufig aufweist, und daß dieses Vorkommen von der Art der Nahrung abhängt. Daß es sich in diesen Fällen nicht um Ausscheidung in der Nahrung vorgebildeter Glyoxylsäure gehandelt hat, geht aus Eppingers Versuchen hervor, wonach 1 bis 2 g Calciumglyoxylat, bei Kaninchen innerlich gereicht, nicht zum Auftreten der Reaktion im Harn Anlaß geben.

In Eppingers Versuchen wurde, wie dies in der Natur der Sache liegt, nicht in jedem Falle, wo im Harn die Indolreaktion auftrat, der nähere Beweis geführt, daß wirklich Glyoxylsäure vorlag. Ob und mit welchen Substanzen, namentlich beim Harn von Pflanzenfressern, eine Verwechslung möglich, und wie sie zu vermeiden ist, war Gegenstand der nachstehenden Versuche.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen benutzt, da bei diesen am häufigsten Auftreten der Reaktion unter normalen Verhältnissen zu beobachten ist. Die Reaktion wurde nach Eppinger ausgeführt.

Man versetzt 2 bis 3 ccm des zu prüfenden Harns mit 6 bis 10 Tropfen einer 1 proz. Indollösung, schüttelt um und unterschichtet vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure. Dabei entsteht, falls Glyoxylsäure vorhanden ist, an der Berührungsstelle ein purpurroter Ring, der sich bei ruhigem Stehen sehr langsam nach oben verbreitert.

Füttert man Kaninchen mit Heu, so zeigt der Harn eine ähnliche Reaktion wie bei Anwesenheit von Glyoxylsäure, und eine Verwechslung ist da um so leichter möglich, als die die Reaktion gebende Substanz bei Destillation mit Phosphorsäure ebenfalls ins Destillat übergeht. Läßt man solchen Harn 2 bis 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen, so geht die Fähigkeit, die Reaktion zu geben, verloren. Auch beim Aufbewahren des Harns unter Toluol wird die Reaktion allmählich schwächer, wenn auch ungleich langsamer. Die Reaktion zeigt gegenüber der echten Glyoxylsäure-Indolreaktion folgende Abweichungen:

1. Sie tritt auch bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure zu dem mit Indol versetzten Harn auf. Die purpurrote Färbung ist dann allerdings nicht so intensiv wie bei Verwendung konzentrierter Säure. Unterschichtet man mit konzentrierter Säure, so

färbt sich sofort die g a n z e überstehende Flüssigkeit kirschrot. Glyoxylsäure gibt die Reaktion mit verdünnter Säure nicht und bei Verwendung konzentrierter Säure zunächst nur an der Berührungsfläche.

2. Die fragliche Substanz bzw. das Harndestillat gibt mit Skatol und konzentrierter Schwefelsäure nur einen gelben Ring an der Berührungsstelle, während Glyoxylsäure einen purpurroten und darüber einen gelben und grünen Ring gibt.

3. Verdünnt man den Harn soweit, daß er mit Indol und konzentrierter Schwefelsäure eben nur eine rosenrote Färbung gibt, so geht die Färbung zuerst in violett, dann in grün über, und nach einigem Stehen scheidet sich ein flockiger grüner Niederschlag ab. Demgegenüber ist die mit Spuren von Glyoxylsäure erhaltene Rosafärbung beständig.

Die Isolierung der fraglichen im Harn vorhandenen Substanz gelang zunächst wegen der allzu kleinen Mengen nicht. Doch konnte sichergestellt werden, daß es sich nicht um Glyoxylsäure handeln konnte. Weder gelang es aus dem Destillate schwerlösliches Calciumglyoxylat darzustellen, noch war eine Reaktion mit Phenylhydrazin zu erzielen; ebensowenig war beim Kochen mit Kalkwasser Bildung von Oxalsäure und beim Digerieren mit Harnstoff in salzsaurer Lösung Bildung von Allantoin nachweisbar.

Wegen des Gehaltes des Heus an aromatischen Stoffen wurde an Phenylglyoxylsäure gedacht. Sie wurde daher zum Vergleich nach dem Verfahren von G l ü c k s m a n n*) dargestellt. Wie zu erwarten, gibt auch diese Säure mit Indol und konzentrierter Schwefelsäure Farbenreaktionen, jedoch in anderer Weise. Beim Unterschichten entsteht an der Berührungsstelle ein orangefarbener Ring, nach längerem Stehen wird die ganze Flüssigkeit rosarot. Mit Skatol und konzentrierter Schwefelsäure gibt die Phenylglyoxylsäure über einem purpurroten einen schmutzig violetten Ring, mit Phenylhydrazin gelbe Nadeln.

Auf die richtige Fährte brachte uns die Untersuchung des Heuaufgusses. Dieser zeigte nämlich nach einigem Stehen gegenüber Indol und Skatol genau das Verhalten des Kaninchenharns. Ein Zusammenhang mit dem Auftreten der Reaktion im Harn mußte um so sicherer angenommen werden, als die Reaktion im Harn nach Aussetzen der Zufuhr von Heu in 3 bis 4 Tagen völlig verschwand, bei neuerlicher Darreichung sofort wieder auftrat. Es wurde daher versucht, die fragliche Substanz aus dem Heuinfus zu isolieren.

*) Monatshefte f. Chemie **11**, 248.

Heu wurde mit Wasser übergossen und damit 24 Stunden stehen gelassen. (Dann ist die Reaktion im Heuinfus am stärksten, Läßt man 3 bis 4 Tage stehen, so verschwindet die Reaktion wieder.) Das Infus wurde mit Phosphorsäure destilliert, wobei die fragliche Substanz im Beginn der Destillation überging, das Destillat mit Kalkwasser alkalisch gemacht, eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Das Alkoholextrakt gab nach Verjagen des Alkohols die Reaktion in der oben für Kaninchenharn angegebenen Art in sehr ausgesprochener Weise, enthielt aber nur sehr wenig organische Substanz. Trocken erhitzt verpuffte der Rückstand; die wässerige Lösung färbte angesäuert Jodstärkekleister tief blau, gab Rotfärbung mit Brucin und die typischen Reaktionen der Nitrite mit p-Phenylendiamin, Diphenylamin und Sulfanilsäure.

Die beobachtete Indolreaktion beruht sonach auf Bildung von Nitrosoindol, und es gelingt leicht durch ausgiebige Verdünnung einer Nitritlösung einen Punkt zu erreichen, wo auch der oben beobachtete Übergang in Grün zustande kommt.

Die Indolreaktion auf Nitrite ist überaus empfindlich. Versetzt man 2 ccm Natriumnitritlösung mit 4 Tropfen 1 proz. Indollösung und 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so erhält man noch bei einem Gehalt von 1 : 4000000 Rotfärbung. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit bei Untersuchung auf Glyoxylsäure völlig nitritfreie Reagenzien zu verwenden. Konzentrierte Schwefelsäure und destilliertes Wasser enthalten nicht selten Spuren von salpetriger Säure. In käuflichem Natriumhydroxyd und Natriumkarbonat scheinen Nitrite regelmäßig vorzukommen.

Vermutlich entsteht das im Heuinfus gefundene Nitrit der Hauptmenge nach durch bakterielle Reduktion aus den vorhandenen Nitraten und verschwindet dann begreiflicherweise bei Weitergehen der Reduktion. Genau so verhält es sich mit dem nitrithaltigen Harn.

Nach dem Gesagten ist es nicht schwer, sich bei der Untersuchung auf Glyoxylsäure vor Verwechslung mit der Nitrosoindolreaktion zu schützen. Es empfiehlt sich zunächst eine Probe mit Indol und verdünnter Schwefelsäure am Harn selbst, dann je drei Proben und zwar: 1. mit konzentrierter Schwefelsäure allein, 2. mit Indol und konzentrierter Schwefelsäure, 3. mit Skatol und konzentrierter Schwefelsäure a) an dem ursprünglichen Harn, b) an dem 3 bis 4fach verdünnten Harn, c) unter allen Umständen an dem sauren Destillat, wie schon Eppinger empfohlen hat, auszuführen. (In diesem Falle ist man vor der störenden Beeinflussung der Reaktion durch alle nicht flüchtigen Harnbestandteile, namentlich die Harnfarbstoffe, geschützt.) Endlich wird direkt auf

die etwaige Anwesenheit von Nitriten mit den bekannten höchst empfindlichen Reaktionen zu prüfen sein.

Die Nitrosoindolreaktion ist auch im Harn von mit Grünfutter ernährten Kaninchen nachzuweisen. Vielleicht war auch die von Eppinger im Harn nach Darreichung von Grünfutter und Zuckerrüben beobachtete Glyoxylsäurereaktion in einem Teile der Fälle durch Nitrite bedingt. Hingegen habe ich sie bei mit Hafer allein ernährten Kaninchen stets vermißt. Es wird sich daher empfehlen, bei Untersuchungen über Ausscheidung von Glyoxylsäure bei Kaninchen diese Art von Fütterung zu wählen. Übrigens muß auch bei Untersuchung von Menschenharn an die Anwesenheit von Nitriten gedacht werden, da ihr Vorkommen im frisch entleerten oder im 24 Stunden alten Menschenharn wiederholt angegeben worden ist.

Was die Herkunft der Nitrite im Harn anlangt, so liegen zwei Möglichkeiten besonders nahe. 1. Sie können aus den Nitraten der Pflanzennahrung stammen, da Heu, Rüben, Kartoffeln bis zu 3,5 Proz. Nitrate (auf Trockensubstanz berechnet) enthalten. Daß sich im Organismus aus Nitraten Nitrite bilden können, ist von Röhmann*) nachgewiesen worden. Die gebildeten Nitrite gehen in den Harn über. 2. Sie können beim Stehen des Harns aus ausgeschiedenen Nitraten entstehen. Da ich bei Kaninchen nach Nitratzufuhr sehr intensive Nitritreaktion im ganz frisch entnommenen Harn erhalten habe, ist die erstere Annahme sicher zutreffend. Daneben mag auch die zweite zu recht bestehen, doch scheint die nachträgliche Entstehung der Nitrite im entleerten Harn keine wichtige Rolle zu spielen. Jedenfalls ist diese Fehlerquelle leicht auszuschalten.

Auffällig ist, daß sich bei Kaninchen nach Grünfutter nicht immer Nitrite im Harn finden. Hier scheinen individuelle Verschiedenheiten maßgebend zu sein. Auch dürfte der wechselnde Gehalt der Pflanzennahrung an Nitraten von Bedeutung sein, da nach Ishizuka**) der Nitratgehalt der Vegetabilien je nach der Regenmenge schwankt. Warum bei Haferfütterung im Kaninchenharn keine Nitrite auftreten, obgleich die Nitrate dem Hafer nicht fehlen, bleibt aufzuklären. Übrigens rief in von mir ausgeführten Versuchen Darreichung von Natriumnitrat bis zu 0,5 g auch beim Menschen keine Nitritausscheidung hervor.

---

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **5**, 233.
) Jahresb. f. Tierchemie **26. 797.

Es ist noch zu bemerken, daß sich im Hundeharn sehr oft eine Substanz findet, die zwar nicht mit Indol, wohl aber mit Skatol einen purpurroten Ring beim Unterschichten mit konzentrierter Schwefelsäure gibt und die auch ins saure Destillat übergeht. Diese von Glyoxylsäure sicher verschiedene Substanz bedarf weiterer Untersuchung.

XXIX.

Fermentwirkung und Fermentverlust.

Von **H. Reichel** und **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Zweite Mitteilung.

In der ersten Mitteilung*) wurde gezeigt, daß das Labferment bei seiner Wirkung an Wirksamkeit einbüßt, daß dieser Verlust jedoch nicht auf die Wirkung selbst, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Verteilung des Ferments zwischen Käse und Molke zu beziehen ist. Der Teilungsfaktor berechnete sich nach den Versuchsergebnissen nicht als Konstante, doch gelang es analog wie in anderen Fällen von Verteilung [v. Georgiewicz**), Arrhenius] durch Einführung eines konstanten Exponenten eine Gleichung aufzustellen, der die gefundenen Resultate mit genügender Genauigkeit entsprachen. Die Gleichung lautete: $V = K . M . R^{8/5}$ worin K eine Konstante, V die verlorene, R die wiedergefundene Labmenge und M die Milchmenge bedeutet.

Die theoretische Deutung eines solchen Exponenten wurde zuerst von Nernst dahin gegeben, daß es sich hierbei um verschiedene Dissoziations- oder Aggregationszustände der verteilten Moleküle in den beiden Phasen des Systems handle. Ausgehend von dieser Vorstellung pflegt man diese Exponenten als Brüche ganzer, einfacher Zahlen anzugeben, da hierin sogleich das Verhältnis der hypothetischen Molekulargrößen in beiden Phasen gegeben erscheint. Es sind jedoch zweifellos auch andere Bedingungen denkbar, die ein solches Verhalten mit sich bringen können.

Namentlich war zu berücksichtigen, daß die Gegenwart anderer Stoffe einen gewissen und zwar nach Erfahrungen des einen von uns gar nicht geringen Einfluß ausübt. Da nun das zu unseren

---

*) Diese Beiträge **5**, 68.

) Monatshefte für Chemie **15, 705, mit E. Löwy, ebenda **16**, 345.

ersten Versuchen verwendete Labpräparat, eine käufliche Essenzlösung, uns in seiner genaueren Zusammensetzung nicht bekannt war, so war daran zu denken, daß etwa darin enthaltene, fremde Stoffe den Verlauf unserer Absorptionskurve bestimmt haben konnten, besonders da die Menge solcher Stoffe mit der Labmenge variieren mußte. Das Präparat erwies sich denn auch als beträchtlich kalkhaltig. Analysen ergaben fast genau 0,5 Proz. CaO, so daß hierin eine Beeinflussung der Absorptionsverhältnisse vermutet werden konnte. Die starke Beeinflussung der Labungsdauer durch Kalksalze ist ja seit Hammarsten bekannt; wir werden in einer weiteren Arbeit noch darauf zurückkommen.

Zu den neuen Versuchen benutzten wir eine 4proz. filtrierte Lösung des Witteschen Labpulvers in 0,9proz. Kochsalzlösung oder in Labungsmolke, von denen sich das erstere als nahezu kalkfrei mit einem Gehalt von 0,006 Proz. CaO erwies. Der Kalkgehalt der Molkenlösung durfte nach unseren a. a. O. dargelegten Erfahrungen als nicht störend betrachtet werden; die Versuchsanordnung entsprach im übrigen der der vorigen Arbeit. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle auf S. 481 ersichtlich.

Die Protokolle I bis VI zeigen mit ziemlicher Genauigkeit, daß bei Anwendung solcher kalkarmen Lablösungen der Wirksamkeitsverlust nach der Labung bei verschiedenen Labmengen prozentisch derselbe ist. Dies bedeutet bei der Annahme einer Verteilung des Labs zwischen Käse und Molke, daß sie nach einem konstanten Faktor verläuft; an Stelle des bei den früheren Versuchen einzuführenden Exponenten $^{8}/_{5}$ tritt hier der Wert 1, so daß wir es hier mit der einfachsten Form des Verteilungssatzes zu tun haben.

Nur bei sehr geringen Labmengen ändert sich der Verlustwert und zwar immer in derselben Art, indem er in beträchtlichem Grade zunimmt. Die einfachste Erklärung dieser Tatsache dürfte sein, daß ein absolut gleich bleibender Anteil am Verlust entweder gesetzmäßig vorhanden ist [entsprechend der Konstante a in der von Ostwald für die Verteilung gegebenen Gleichung C (Teilungsfaktor) = a (konstanter Grenzwert) + b . p (Faktor × Konzentration)] oder durch die mannigfachen Manipulationen gleichmäßig bedingt wird. Ein solcher konstanter Verlust fällt natürlich erst in verdünnten Lösungen prozentisch ins Gewicht.

Um nun den Einfluß des Kalks auf die Labverteilung kennen zu lernen, haben wir eine weitere Reihe von Versuchen in der Art angestellt, daß wir einerseits die Lablösung mit Chlorcalcium

1	2	3	4	5	6	7	8
					8 ccm Milch gerinnen		
Nummer	Milch	Lab	Molke	Zeit in Sek.	mit 2 ccm Filtrat von 2 bis 4 in "	mit 2 ccm, die 1/5 der Labmengen in 3 enthalten, in "	Verlust Proz.
I							
1	8	0,2	1,8	88	504	445	11,70
2	"	1,0	1,0	24	93	83	10,75
3	"	2,0	—	13	51	45	11,77
II							
1	8	0,2	1,8	87	426	390	8,45
2	"	2,0	—	11,6	52,4	48	8,40
III							
1	8	1,0	1,0	30	124	112	9,68
2	"	2,0	—	14	65	58,6	10,76
IV							
1	9	0,2	0,8	52	387	463	19,6
2	"	0,5	0,5	27	156	182	16,7
3	"	1,0	—	14	80	93	16,5
V							
1	8	0,2	1,8	50	175	205	14,15
2	"	0,5	1,5	24	82	88	6,82
3	"	1,0	1,0	15	49	52,5	6,67
4	"	2,0	—	9	29	31	6,25
VI							
1	8	0,2	1,8	61	235	335	29,85
2	"	0,3	1,7	44	173	237	26,59
3	"	0,5	1,5	29	107	132	18,93
4	"	1,0	1,0	20	63	78	19,23
5	"	2,0	—	14	37	45	17,78

versetzten, so daß das Verhältnis Lab zu $CaCl_2$ in der Probe konstant war, anderseits zu verschieden labhaltigen Proben gleiche Mengen $CaCl_2$ hinzufügten. In allen kalkhaltigen Proben war der Wert des Verlustes bedeutend erhöht, in denen, wo die Ca-Menge konstant (0,2 Proz. $CaCl_2$) war, stieg die Verlustzahl schon bei höherer Labkonzentration und relativ stärker als in den chlorcalciumfreien Proben (Protokoll VI). Der Verlust nahm also nicht nur mit der Menge des $CaCl_2$, sondern auch mit dem Verhältnis $CaCl_2$ zu Lab zu.

1	2	3	4	5	6	7	8
					8 ccm Milch gerinnen		
Nummer	Milch	Lab	Molke	Zeit in Sek.	mit 2 ccm Filtrat von 2 bis 4 in "	mit 2 ccm, die $^1/_5$ der Labmengen in 3 enthalten, in "	Verlust Proz.
VII	(Jede Probe enthält 0,2 Proz. $CaCl_2$.)						
1	8,0	0,2	1,8	14	102	177	42,37
2	"	0,5	1,5	8	55	76	27,63
3	"	1,0	1,0	7	32	43	25,58
4	"	2,0	—	5	20	27	25,92
VIII	(Jede Probe enthält 0,2 Proz. $CaCl_2$.)						
1	8,0	0,2	1,8	12	108	187	42,25
2	"	0,3	1,7	9	83	132	37,12
3	"	0,5	1,5	7	53	82	35,37
4	"	1,0	1,0	6	32	45	28,91
5	"	2,0	—	5	21	28	25,00
IX	(Lablösung enthält 1 Proz. $CaCl_2$.)						
1	8,0	0,5	1,5	15	68	76	10,53
2	"	1,0	1,0	7	34	39	14,71
3	"	2,0	—	5	18	23	22,25
X	(Lablösung enthält 1 Proz. $CaCl_2$.)						
1	8,0	0,2	1,8	45	356	493	27,79
2	"	0,3	1,7	29	185	245	24,49
3	"	0,5	1,5	15	110	146	24,62
4	"	1,0	1,0	7	50	66	24,23
5	"	2,0	—	5	21	28	25,00
XI	(0,5 Proz. CaO enthaltende Labessenz.)						
1	8,0	0,5	1,5	50	326	342	4,68
2	"	1,0	1,0	26	136	147	7,48
3	"	2,0	—	17	58	70	17,14

In Übereinstimmung damit zeigen die Protokolle IX und X, in denen das Verhältnis $CaCl_2$ zu Lab konstant war, ein geringeres Ansteigen des Verlustes mit fallender Labkonzentration (X) als die Reihen mit konstantem $CaCl_2$-Gehalt (VII, VIII) oder ein direktes Absinken, welch letzteres auch bei Anwendung der käuflichen Lablösung wieder festzustellen war (XI). Die relative Abnahme des Verlustes mit der Labverdünnung ist in diesen Versuchen durch die parallele Abnahme der Kalkkonzentration bedingt.

Damit scheint uns die Form der in der ersten Arbeit mitgeteilten Verlustkurven hinreichend aufgeklärt zu sein und wir halten für erwiesen, daß bei Abwesenheit störender

Salze der Verlust an Ferment bei der Labwirkung durch den Verteilungssatz in seiner einfachen Form erklärt wird.

Bei der spezifischen Wirkung, die Kalksalze auf die zeitliche Dauer der Labung ausüben, lag es nahe, die eigentümliche Verlustkurve damit in Zusammenhang zu bringen; dabei ist allerdings zu bedenken, daß die Verteilung in unseren Versuchen zwischen Käse (Parakasein) und Lab und nicht zwischen Kasein und Lab stattfand; immerhin wäre bei der weitgehenden Ähnlichkeit beider Körper ein Parallelismus nicht ausgeschlossen.

Die für die Auswertung der Fermentgesetze nicht unwichtige Frage war experimentell dadurch exakt zu beantworten, daß wir außer den Kalksalzen auch andere gerinnungsbefördernde und -hemmende Stoffe bezüglich ihres Einflusses auf die Verteilung prüften. Von Stoffen der ersteren Art haben wir außer mit Chlorcalcium noch mit Chlormagnesium, von hemmenden mit Harnstoff, Rhodankalium und Glycerin Versuche angestellt [Protokoll XII]*).

XII

1	2	3	4	5	6	7	8	9
						8 ccm Milch gerinnen		
Nummer	Milch	Lab	Molke	2 ccm isot. Lös.	Zeit in Sek.	mit 2 ccm Filtrat von 2 bis 5 in "	mit 2 ccm, die $^1/_5$ der Labmengen in 3 u. entspr. Mengen isot. Lösung enthalten, in "	Verlust Proz.
1	6,0	2,0	—	Molke (Kontrolle)	14	80	88	9,09
2	"	1,0	1,0		6	39	43	9,30
3	"	2,0	—	$CaCl_2$	4	43	72	43,6
4	"	1,0	1,0		3	22	34	35,3
5	"	2,0	—	$MgCl_2$	4	39	56	30,77
6	"	1,0	1,0		3	24	29	17,28
7	"	2,0	—	CNSK	22	80	98	18,37
8	"	1,0	1,0		9	47	53	11,44
9	"	2,0	—	Glycerin	13	71	105	32,38
10	"	1,0	1,0		6	34	51	33,33
11	"	2,0	—	Harnstoff	14	50	118	57,62
12	"	1,0	1,0		6	23	56	58,92

*) Über die Wirkung, die die angegebenen Stoffe in isotonischer Lösung auf die Labgerinnung ausüben, berichten wir in der folgenden Arbeit.

Die vorstehenden Protokolle zeigen, daß dem Chlormagnesium ein ähnlicher, jedoch schwächerer Einfluß auf die Verteilung zukommt wie dem Chlorcalcium, während die Wirkung auf die Gerinnungsdauer bei beiden Salzen nahezu die gleiche ist. Das Rhodankalium bewirkt eine geringe Erhöhung des Verlustes, ansteigend mit dem Verhältnis des Fermentes zum Salz. Glycerin und Harnstoff hingegen erhöhen den Verlust sehr beträchtlich, der jedoch unabhängig von der Labkonzentration bleibt.

Der gefundene Verlust ist hier wohl nicht allein durch die Verteilung zu erklären, da einzelne der Stoffe vielleicht das Ferment selbst schädigen; trotzdem lassen aber die vorliegenden Zahlen einen Parallelismus zwischen Beeinflussung der Verteilung und der Gerinnungszeit ausschließen.

Dort werden wir auch auf die in der ersten Mitteilung berührte Frage, welchen Einfluß das Milchvolumen auf die Gerinnungszeit hat, ausführlicher eingehen. Die früher angenommene Unabhängigkeit der Gerinnungszeit vom Milchvolumen gilt nur innerhalb gewisser Grenzen annäherungsweise; dadurch wird jedoch die Grundlage des Milchvariationsversuchs der vorigen Arbeit (Tabelle XI, Versuch 9) nicht berührt.

XXX.

Beeinflussung und Natur des Labungsvorgangs.

Von **H. Reichel** und **K. Spiro.**

Erste Mitteilung.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Im Zusammenhang mit anderen bereits veröffentlichten Untersuchungen über die quantitativen Verhältnisse beim Labungsprozeß haben wir uns bemüht, seine allgemeinen Wirkungsgesetze kennen zu lernen, d. h. den Einfluß der Variation seiner einzelnen normalen Komponenten sowie den hinzutretender Umstände zu bestimmen. Zwar liegt hierüber schon eine große Anzahl von Erfahrungen vor*), auch hat sich unsere Hoffnung, eine zutreffende Darstellung der Verhältnisse besonders einfach gestalten zu können, nicht ganz erfüllt; doch scheint es uns trotzdem gerechtfertigt, eine zusammenfassende Darlegung unserer Ergebnisse und eine kurze Erörterung der für den Prozeß giltigen Gesetze zu geben.

I.

Das sogenannte Zeitgesetz der Labwirkung — die Annahme einfacher und umgekehrter Proportionalität zwischen der Gerinnungsdauer der Milch und der angewandten Menge des Ferments — wurde von vielen Autoren aufgestellt, doch meist mit verschiedenen Einschränkungen versehen; so sollte nach der Meinung der einen bei einer gewissen Fermentmenge ein Optimum erreicht sein, dessen Wirkung durch vermehrte Dosen nicht mehr zu überschreiten war, nach anderen sollten sehr geringe Mengen eine immer schwächere und schließlich keine Wirkung mehr ausüben.

---

*) Wir verweisen bezüglich der sehr umfangreichen Literatur auf die treffliche kritische Darstellung Fulds im ersten Band der Ergebnisse der Physiologie.

E. Fuld*) konnte aber zeigen, daß sich eine solche Proportionalität einerseits für große Labmengen bis an die untere Grenze kontrollierbarer Zeitwerte, anderseits für kleine (mittels einer Modifikation der Morgenrothschen Kältemethode) anscheinend beliebig weit über Tage hinaus verfolgen läßt. Damit war ein äußerst wertvolles Mittel zur quantitativen Fermentbestimmung gewonnen.

Doch erfährt die Gültigkeit des Zeitgesetzes eine störende Einschränkung durch die Bedingung eines konstanten Verdünnungszustandes der Milch. Nur durch eine unabhängige Variation von Volumen und Milchmenge war aber Aufschluß darüber zu erhoffen, ob es die Konzentration oder die Menge des Labferments ist, welche als wirksam betrachtet werden muß. Denn solange eine Volumenvermehrung nur durch Zufügung neuer Milch gestattet war, konnte nicht entschieden werden, ob es die Vermehrung der Kaseinmenge oder die Verdünnung des Labs ist, welche die Gerinnungszeit länger gestaltet. Bei künstlicher Verdünnung mit anderen Lösungen aber ist die Änderung der Gerinnungszeit wenigstens zum Teil auf eine Konzentrationsverschiebung der wirksamen Salzionen zu beziehen. Hierdurch und durch Änderung des osmotischen Drucks würde die Beziehung zwischen Gerinnungszeit und Kaseingehalt verdeckt werden.

Gerade in der Kalkverdünnung erblickte Hammarsten eine der wesentlichsten durch Verdünnung hervorgerufenen Störungen. E. Fuld acceptierte diese Erklärung und glaubte die Störung dadurch ausschalten zu können, daß er als Verdünnungsmittel erstens eine durch Ansäuerung von Milch gewonnene, später wieder neutralisierte Molke oder zweitens Kaseinlösungen mit dem Erdalkaligehalt der Milch verwandte. Fuld findet bei diesen Versuchen eine der Kaseinmenge proportionale Abkürzung der Gerinnungszeit, so daß der Quotient Lab zu Kasein allein die Gerinnungszeit bestimmt.

II.

Wir sind bei unseren Versuchen**) von der Absicht ausgegangen, das chemische Gefüge der Milch durch das Verdünnungsmittel so wenig als möglich zu stören, was von der Anwendung

*) Diese Beiträge 2, 169.

**) Für die dem einen von uns erteilte freundliche Erlaubnis, einige ergänzende Versuche im k. k. Hygienischen Institut zu Wien anstellen zu dürfen, sei Herrn Prof. Schattenfroh auch an dieser Stelle herzlicher Dank ausgesprochen.

von Molke am ehesten zu hoffen war. Neutralisierte Säuerungsmolke war jedoch sowohl nach den Erfahrungen Fulds als auch deswegen zu vermeiden, weil Zusatz von Alkali, selbst von Soda, zur Molke, auch wenn dadurch nur überschüssige Säure neutralisiert wird, das Labferment weitgehend verändert. Wir verwendeten daher eine Molke, aus der das Kasein durch sehr langsame Labung entfernt war, so daß die von ihr entfaltete Labwirkung neben der in unseren Versuchen angewandten vernachlässigt werden konnte; der Fehler durch den Labgehalt dieser Molke konnte unter unseren Versuchsbedingungen allerhöchstens 1 Proz. betragen, was innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Natürlich war aber trotzdem die Vorsicht nötig, die Mischung von Molke und Milch jedesmal erst unmittelbar vor dem Versuch zu bereiten.

I.					II.		III.	
Nummer	ccm Milch	ccm 35 % Lab mit Molke verdünnt	ccm Molke	Beobachtete Zeit T in "		Beobachtete Zeit T in "		Beobachtete Zeit T in "
1	0,5	0,5	4,0	22	Dasselbe mit anderer Molke	22	Dasselbe mit anderer Molke	33
2	1,0	"	3,5	17		25,5		27
3	1,5	"	3,0	18		27		28
4	2,0	"	2,5	17		25,5		26,5
5	2,5	(Labkonz. = 0,035)	2,0	18		24,5		25,5
6	3,0		1,5	16		26		26
7	3,5		1,0	16		26		24
8	4,0		0,5	15		25		26
9	4,5	0,5	—	16		24		27

Die ersten Versuche (I bis III), welche mit arithmetisch steigender Milchmenge, also mit verhältnismäßig geringen Verdünnungsunterschieden angestellt wurden, ergaben das überraschende Resultat, daß die Gerinnungsdauer von einer Konzentration der Lösung an Milch (Kasein) von 20 Proz. angefangen bis zu 90 Proz. innerhalb der Fehlergrenzen identisch war. Nur in den verdünntesten Lösungen (10 Proz.) war eine Verlängerung der Gerinnungsdauer zu beobachten. Die auffällige Konstanz der Zeit bei so wechselnden Verhältnissen Lab zu Kasein mußte zu der Auffassung führen, daß nicht dieses Verhältnis, sondern die absolute Labkonzentration (Lab zu Volumen) diese Zeit bestimme.

Sehr ähnliche Resultate ergaben Vergleichsversuche (Protokolle IV und V), in denen die Molke durch 0,9 proz. Kochsalzlösung

ersetzt wurde, nur war hier die Abweichung von der Konstanz der Zeitdauer schon bei einer geringeren Verdünnung (20 Proz.) und stärker zu beobachten, namentlich wenn die angewandte Lablösung verdünnter war (Protokoll VI).

IV. V.

Nummer	ccm			Beobachtete Zeit T in "		Beobachtete Zeit T in "
	Milch	Lab 35 Proz.	NaCl-Lösung 0,5 Proz			
1	0,5	0,5	4,0	40	Dasselbe mit 0,9 proz. NaCl-Lösung	40
2	1,0	„	3,5	17		18
3	1,5	„	3,0	17,5		14
4	2,0	„	2,5	17		„
5	2,5	(Labkonz. = 0,035)	2,0	„		„
6	3,0		1,5	„		„
7	3,5		1,0	„		„
8	4,0		0,5	„		„
9	4,5	0,5	—	„		„

VI.

Nr.	Milch	Lab 10 Proz.	NaCl 0,9 Proz.	Beobachtete Zeit T in "
1	1,0	1,0	8,0	260
2	2,0	„	7,0	112
3	3,0	„	6,0	64
4	4,0	„	5,0	44
5	5,0	„	4,0	38
6	6,0	„	3,0	36
7	7,0	„	2,0	35
8	8,0	„	1,0	„
9	9,0	„	—	„

Die bisher besprochenen Versuche waren mit käuflicher, d. h. mit salz- spez. kalkhaltiger Lablösung (0,5 Proz. CaO) angestelllt worden; für die folgenden Versuche diente eine Lösung des praktisch kalkfreien Witteschen Labpulvers in Kochsalzlösung (0,9 Proz.) oder in Molke.

Ausgedehntere Versuchsreihen mit stärkerer Variationsbreite der Milchverdünnungen bis zu 2 Proz. (Protokoll VII) zeigten nun, daß die Differenz der Gerinnungszeiten verdünnter Milch gegenüber konzentrierter der Differenz der Verdünnungszustände (Volumen zu

Milch) annähernd einfach proportional war. Nur bei extremen Labkonzentrationen nach beiden Richtungen fanden wir Abweichungen von diesem Gesetze, die wegen ihres regelmäßigen

VII.

Nummer	Milch	Lab	Molke	Zeit in "	Konstanzzahl = $(T-T')\left(\frac{M}{V-M}\right)$
1	0,2	1,0	8,8	110	1,60
2	0,4	"	8,6	70	1,91
3	0,6	"	8,4	50	1,81
4	0,8	"	8,2	42	1,77
5	1,0	"	8,0	39	1,93
6	1,25	"	7,75	33	1,63
7	1,5	"	7,5	31,2	1,69
8	1,75	"	7,25	29,6	1,70
9	2,0	"	7,0	28,6	1,75
10	2,5	"	6,5	27	1,80
11	3,0	"	6,0	26	1,88
12	4,0	"	5,0	24	1,60
13	5,5	"	3,5	23	1,71
14	8,0	"	1,0	22	1,60

(Extrapol. Zeit T' = 21,6)

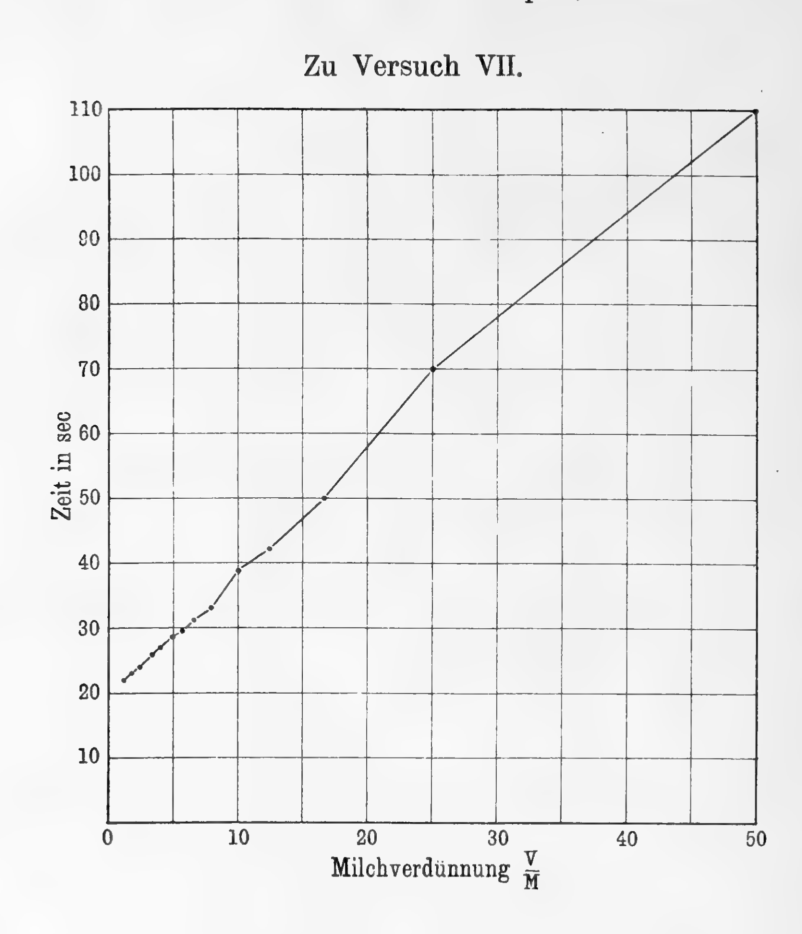
Auftretens Beachtung verdienen. Der einfachste Ausdruck jener sonst durchweg herrschenden Proportionalität wäre

$$(T - T')\left(\frac{M}{V - M}\right) = \text{Konst.},$$

worin T und T' die Gerinnungszeiten der verdünnten und unverdünnten Milch, M die Milchmenge, V das Volumen in ccm bedeutet. Der letzte Stab der Tabelle VII gibt die Zahlen für diesen Ausdruck. Der zur Berechnung der Konstanzzahl benutzte Wert T' = 21,6" ist hier durch Extrapolation angenommen. Die Kurve mit der Koordinaten T und $\frac{V}{M}$ veranschaulicht das Verhältnis. (Siehe Kurve auf Seite 490.)

Der Versuch VIII gibt derartige Kurven für wechselnde Labkonzentration. Die Konstante ist von L (Labmenge) nicht unabhängig, sondern sie wächst mit dem Sinken dieses Wertes. Eine einfache Beziehung läßt sich jedoch aus den wenigen vorliegenden Zahlen nicht ableiten. Ferner wird hier die eine Gültigkeitsgrenze des obigen Gesetzes ersichtlich: Proben, in denen Ferment und Milch stark verdünnt sind, gerinnen in etwas kürzerer Zeit als dem Gesetz entspricht.

Zu Versuch VII.



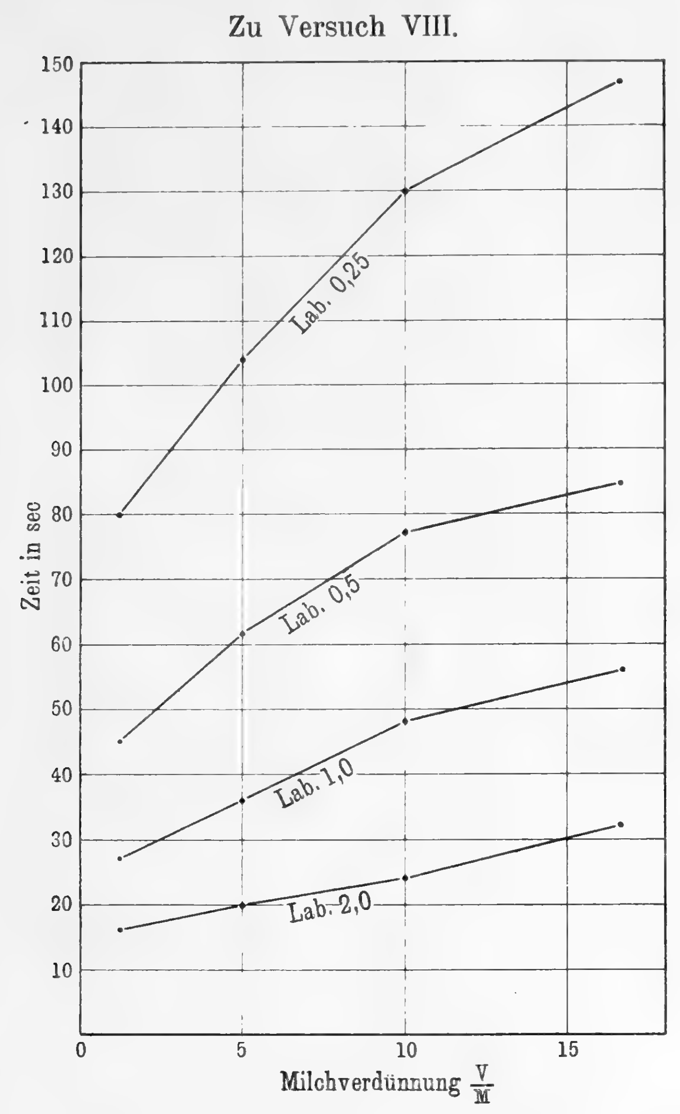
Inwieweit die verdünnteren Milchproben dem sogenannten Zeitgesetz folgen, läßt sich am einfachsten an den beigegebenen Kurven überblicken. Dieselben zeigen eine umso stärkere Abweichung von der gesetzmäßigen durch den Mittelpunkt gehenden geraden Linie, je stärker die Milch verdünnt war. Die labarmen Proben gerinnen dabei rascher als dem Gesetz entspricht. Ähnliche Kurvenwerte für verdünnte Milch haben Pawlow und Parastschuk*) in der allerjüngsten Zeit mitgeteilt.

VIII.

Nr.	Milch	Molke	Zeiten in Sek. für Lab				Konstanzzahlen für Lab			
			2.0	1,0	0,5	0,25	2.0	1,0	0,5	0,25
1	0,6	ad 10 ccm	32	56	84,6	147	1,04	1,89	3,26	4,37
2	1,0		24	48	77	130	0,92	2,51	3,67	5,72
3	2,0		20	36	61,6	104	1,06	2,40	4,40	6,25
4	8,0		16	27	45	80	1,00	2,40	4,00	6,00
(Extrapol. Zeit T' :			15,75	26,4	44	78,5)				

*) Zeitschrift f. physiol. Chemie **42**, 415.

Zu Versuch VIII.

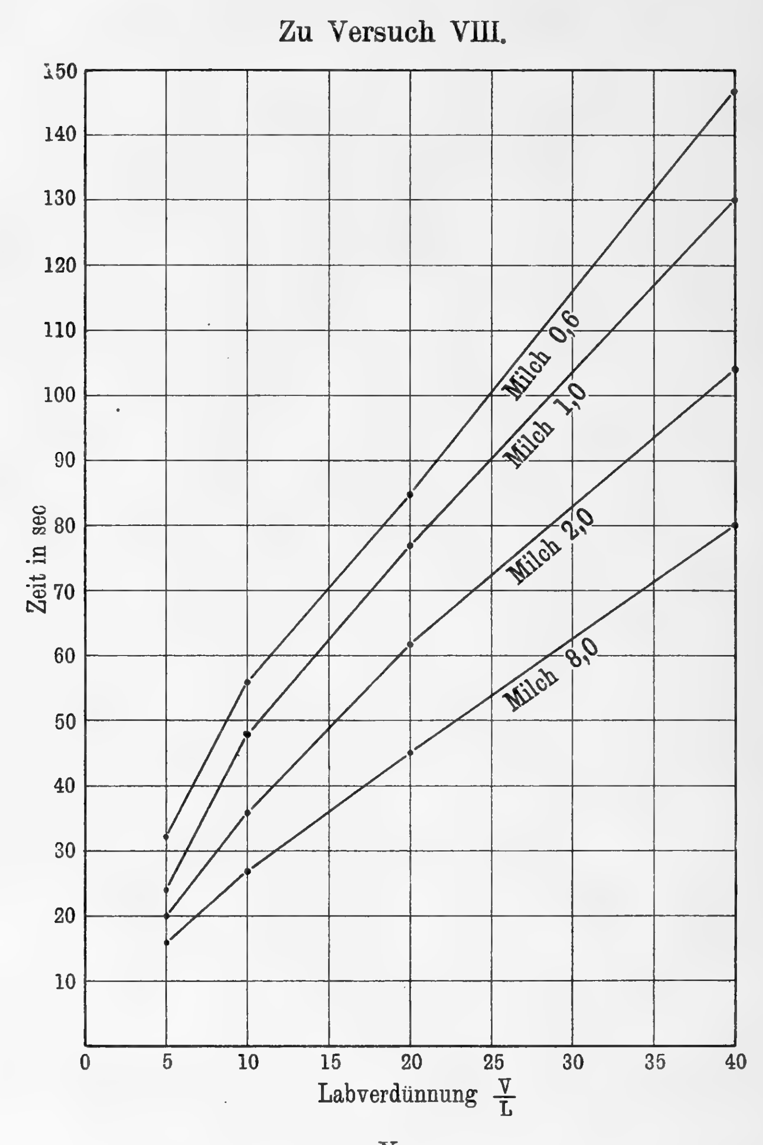


Parallelversuche mit Kochsalzlösung ergaben wiederum sehr ähnliche Resultate mit der einzigen Ausnahme, daß hier Proben, die gleichzeitig wenig Kasein und wenig Lab enthielten, längere Zeiten in Anspruch nahmen, als der obigen Gesetzmäßigkeit entsprochen hätte.

IX.

Nr.	Milch	Na Cl 0,9 %	Zeiten in Sek. für Lab 2,0	1,0	0,5	0.25	Konstanzzahlen für Lab 2,0	1,0	0,5	0.25
1	1,25	ad 10 ccm	14	42,6	100	450	0,98	4,44	11,69	59,28
2	1,75		12	32	72	194	1,03	4,35	11,03	33,77
3	2,5		10	25	53	109	0,95	4,50	11,00	24,7
4	4,0		9	18	38	69	1,23	4,33	12,00	22,6
5	8,0		7,4	12,6	23	41	1,00	4,40	12,00	24,0
(Extrapol. Zeit T' :			7,15	11,5	20	35)				

Zu Versuch VIII.



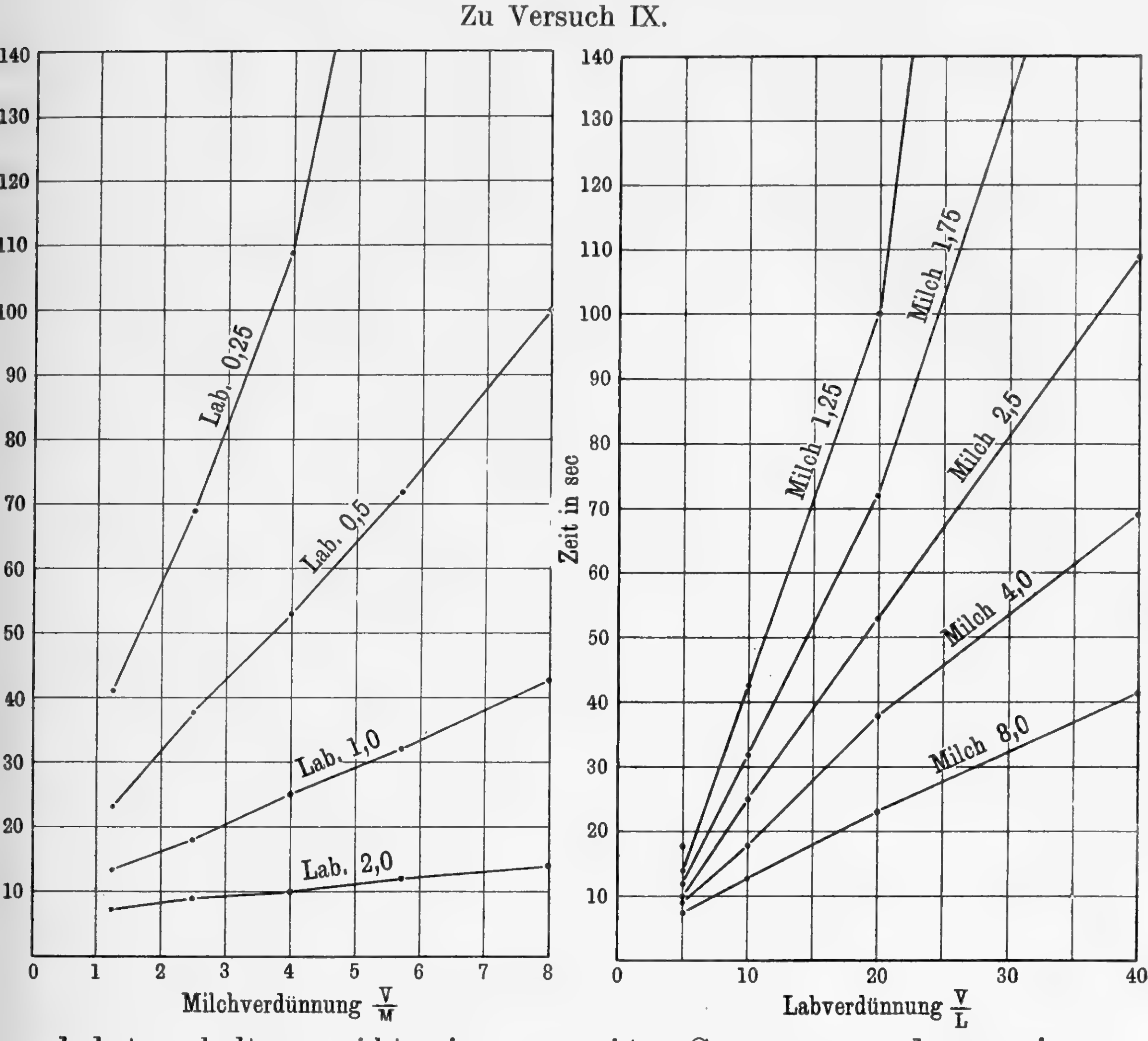
X.

Nr.	Milch	Lab	Na Cl 0,9 %	Zeit in "	Konstanzzahl = $(T—T') \cdot \left(\frac{M}{V-M}\right)$
1	0,7	1,0	8,3	37	2,10
2	0,9	"	8,1	30	2,07
3	1,25	"	7,75	23	1,99
4	2,5	"	6,5	15	1,97
5	8,0	"	1,0	9,6	2,00

(Extrapol. Zeit T' = 9,1)

Während also die eine Gültigkeitsgrenze unseres Gesetzes bei starker Lab- und starker Milchverdünnung liegt und die Molken- und Kochsalzversuche sich hier bezüglich der Richtung der Ausnahme umge-

Zu Versuch IX.

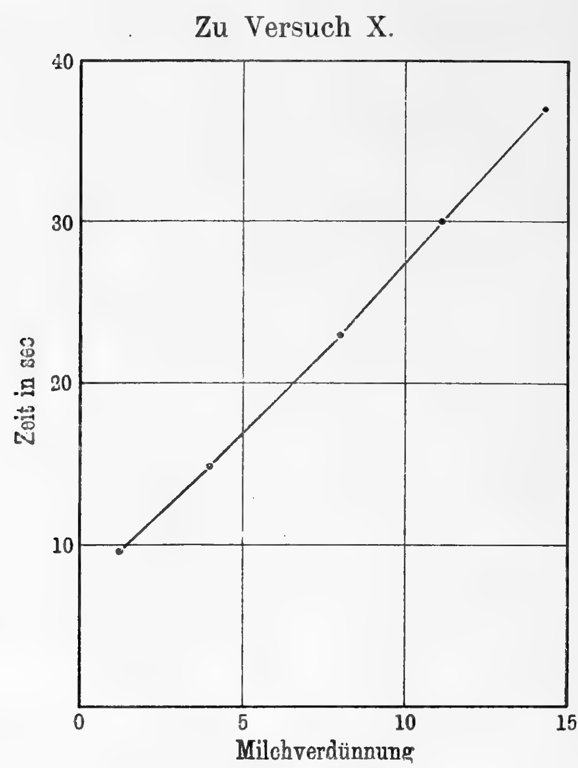


kehrt verhalten, gilt eine zweite Grenze, und zwar in gleicher Weise bei Molken- und Kochsalzversuchen für sehr starke Labkonzentration besonders bei geringer Milchverdünnung. Hier kommt es nämlich vor, daß die Gerinnungszeit in den verdünnten Milchproben kürzer ausfällt als in den weniger verdünnten: es findet sich dann ein Optimum für die Gerinnungszeit bei mäßiger Milchverdünnung (Versuch XI und XII).

XI. / XII.

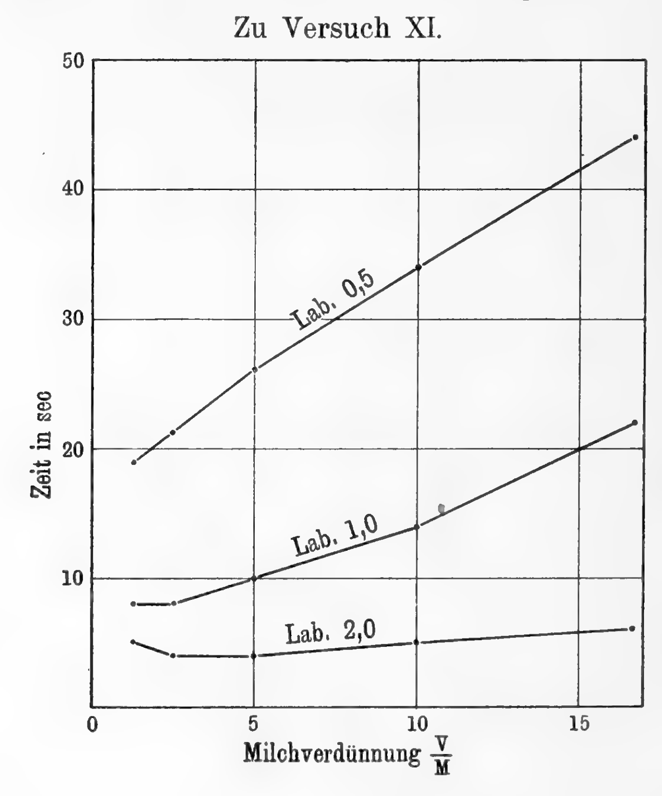
Nr.	Milch	Molke	Zeiten in " für Lab 2,0	1.0	0,5		XII. Zeiten in " für Lab 2,0	1,0
1	0,6	ad 10 ccm	6	22	44	Dasselbe mit anderer Molke	16	22
2	1,0		5	14	34		10	16
3	2,0		4	10	26		6	13
4	4,0		4	8	21		7	11
5	8,0		5	8	19		8	13

Zu Versuch X.



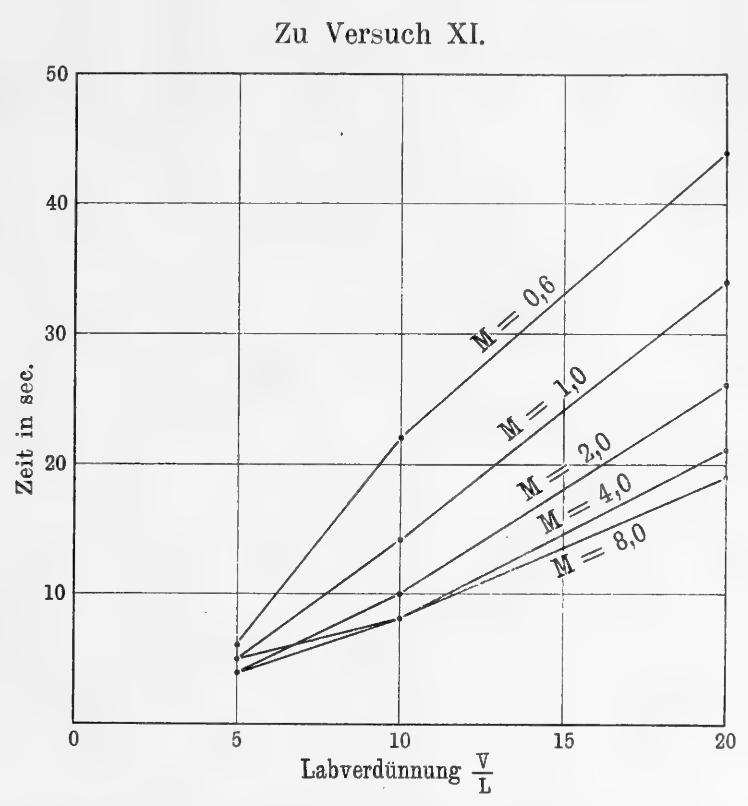
Die Kurven des Zeitfermentgesetzes zeigen in diesen Fällen, wie ersichtlich, eine Überschneidung in ihrem Anfangsteil. Die starke Konvergenz der entsprechenden Kurven in Figur VIII und IX läßt vermuten, daß es sich dabei um allgemeine Verhältnisse

Zu Versuch XI.



handelt, die nur dort nicht in Erscheinung treten, sei es, weil die Fermentkonzentration nicht genügend hoch war, sei es infolge unkontrollierbarer Verschiedenheiten der Versuchsbedingungen z. B. minimaler Differenzen des Säuerungszustandes oder dergleichen.

Zu Versuch XI.



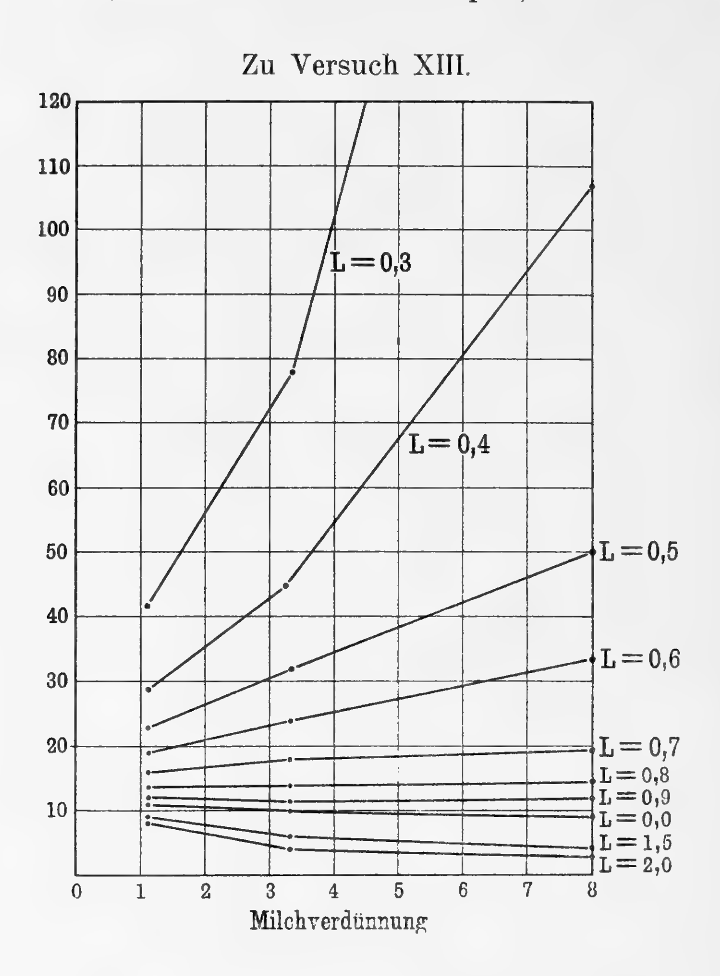
Die geschilderte, mit der Variation der Fermentmenge einhergehende Umkehrung der Abhängigkeitsform zwischen Zeit und Milchverdünnung tritt noch weit ausgesprochener auf bei Verwendung kalkhaltiger Lablösung (Versuch XIII); dies muß, wie aus

XIII.

Nr.	Milch	Na Cl 0,9 %	Zeiten in Sekunden für Lab 2,0	1,5	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
1	1,25	ad 10 ccm	3	4	9	12	14,5	19	33	50	107	810
2	3,0		4	6	10	11,5	14	18	24	32	45	78
3	9,0		8	9	11	12	14	16	19	23	29	42

der Tabelle ersichtlich, bei gewissen mittleren Labkonzentrationen zu einer Konstanz der Gerinnungszeit führen. Hierauf dürften die eingangs angeführten, so auffällig konstanten Gerinnungszeiten bei wechselnder Milchmenge (Versuche I bis V) bezogen werden können.

Zu Versuch XIII.

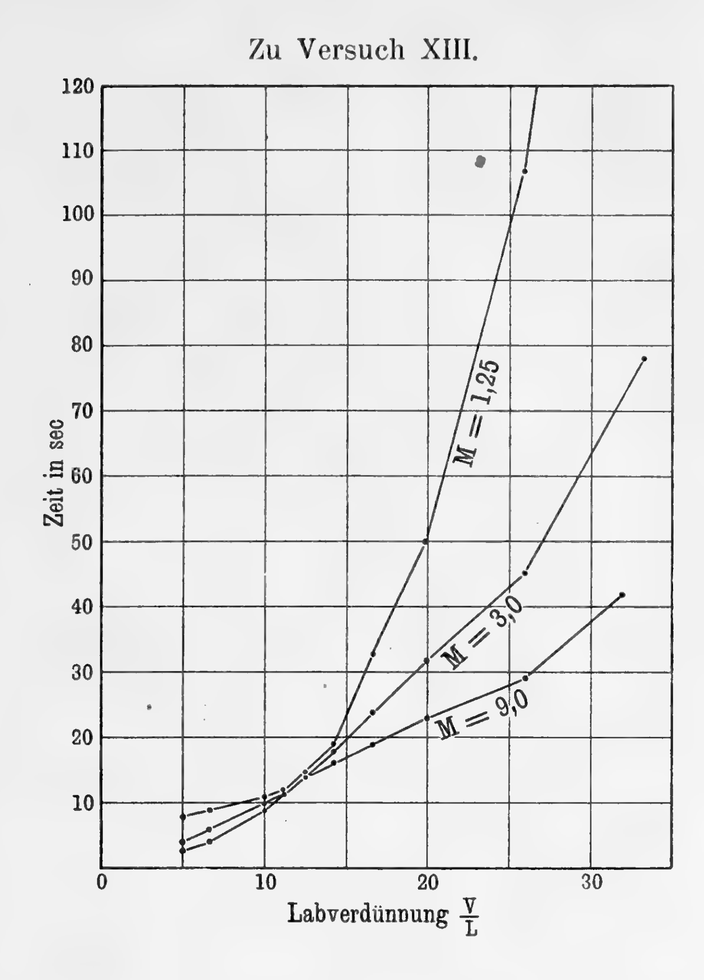


III.

Nachdem diese Versuche die Beziehungen zwischen Gerinnungsdauer und Kaseingehalt der Proben bei Verdünnung mit Labungsmolke und isotonischer Kochsalzlösung genügend überblicken ließen, war es möglich, an die Frage der Abhängigkeit dieser Beziehungen zum Kalkgehalt heranzutreten. Nach den in der Literatur vorhandenen Zahlen (Söldner) enthält die Molke weniger Kalk als die Milch, so daß bei der Verdünnung mit Molke sicher gleichzeitig eine Kalkverdünnung eintritt; doch erscheint es von vornherein auffällig, daß die offenbar bei weitem stärkere Kalkverdünnung durch Kochsalzlösung kaum andere Resultate lieferte als die Molkenverdünnung. Nach unseren Analysen enthielt die Molke etwa 0,5 ‰ CaO; es war zu prüfen, ob entsprechend konzentrierte Kalksalzlösungen als Verdünnungsmittel auf die Labungsdauer anders wirkten wie die Molke.

Versuch XIV zeigt, daß eine entsprechende (1 ‰) Chlorcalciumlösung im Gegensatz zur Molke die Gerinnungszeiten stark herabsetzt, während eine Calciumlaktatlösung (2 ‰) in gleicher

Zu Versuch XIII.



XIV.

Nr.	Milch	Lab	Zeiten in Sekunden für ad 10 ccm	
			1 ‰ $CaCl_2$	2 ‰ $Ca(C_3H_5O_3)_2$
1	0,6	1,0	9	12
2	1,0	„	11	14
3	2,0	„	14	16
4	8,0	„	19,6	24

Richtung, doch wesentlich schwächer wirkt. Die Isotonie der beiden Lösungen war durch Kochsalz hergestellt. Die Verschiedenheit der Wirkung dieser Lösungen und der Molke, die analytisch gleiche Quantitäten Ca enthielten, ist wohl am einfachsten auf einen verschiedenen Gehalt an Ca-Ionen zurückzuführen. Die Ähnlichkeit der Molken- und Kochsalzversuche spräche dann für eine sehr geringe Ionisation der Ca-Salze in der Molke.

Zunächst war es nun von Interesse zu untersuchen, welchen Einfluß die Ca-Ionen auf die Labungsdauer haben. Zu diesem

Zweck wurden Versuche mit wechselndem Chlorcalciumgehalt bei sonst gleichen Bedingungen gemacht. Die drei Reihen des Versuchs XV unterscheiden sich unter einander nur durch verschie-

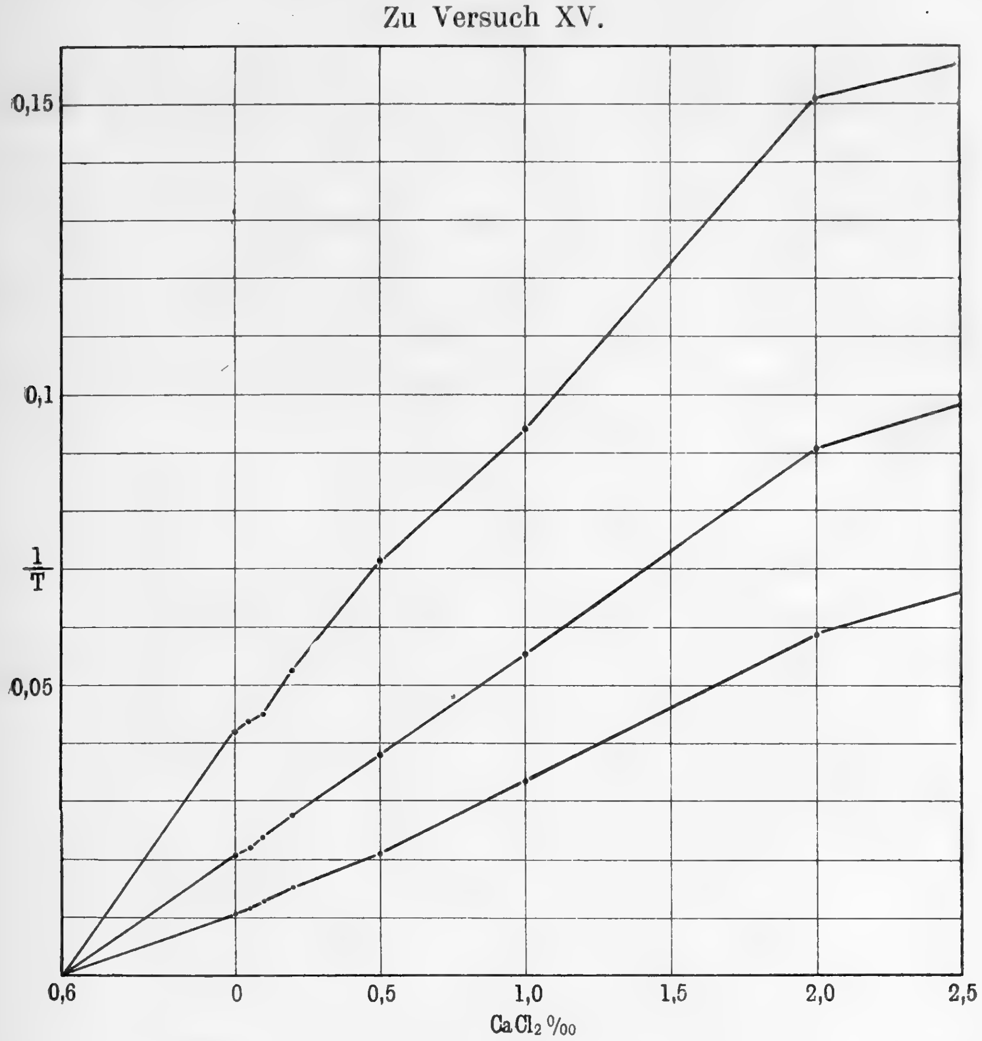
XV.

Nr.	Milch	$CaCl^2$ ‰	Zeit für Lab			Konstanzzahl*) = $Ca^{\cdot\cdot}$. T für Lab		
			1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25
1	8,0	—	95	48	24	57,0	28,8	14,4
2	„	0,05	88,6	45,6	23	57,6	29,6	15,0
3	„	0,1	79	41,6	22	55,3	29,1	15,4
4	„	0,2	66,4	36	19	53,1	28,8	15,2
5	„	0,5	48	26,4	14	52,8	29,0	15,4
6	„	1,0	30	18,2	10,6	48,0	29,1	17,0
7	„	2,0	17	11	6,8	44,2	28,6	17,7
8	„	5,0	10	7,4	5,4	56,0	41,4	30,2
9	„	10,0	13	9,2	6,2	137,8	97,5	65,7
10	„	20,0	22	15	8,6	453,2	309,0	177,2

denen Labgehalt. Der Einfluß des $CaCl_2$ erweist sich in dem Versuche innerhalb einer nicht unbeträchtlichen Breite seiner Konzentration als einfach und gerade proportional der Differenz der reziproken Zeitwerte $(1/T' - 1/T) : CaCl_2 = $ Konst., worin T' die durch Kalkzusatz verkürzte Zeit bedeutet. Unter der durch Hammarstens und Arthus' Versuche gestützten Annahme, daß die Gerinnungszeit bei vollständiger Abwesenheit von wirksamem Kalk gleich unendlich, ihr reziproker Wert also gleich 0 wird, unter der Annahme ferner, daß die Gerinnungszeit normaler Milch in analoger Weise von ihrem Gehalt an wirksamem Kalk abhängt wie die nach Ca-Zusatz verkürzten Zeiten von dem Zusatz, geht die Gleichung in die Form über: $T' . (CaCl_2 + a) = $ Konst., worin a den wirksamen Kalkgehalt der normalen Milch bedeutet. Man kann sich diese Verhältnisse am einfachsten zur Anschauung bringen, wenn man in Kurve XV die Gerade bis zum Schnittpunkt) mit der Abszissenachse verlängert, dann bedeutet die links vom Nullpunkt gelegene Strecke den wirksamen Kalkgehalt der normalen Milch. Betrachten wir nach den obigen Ausführungen als wirksamen Kalk die Ca-Ionen und nehmen wir an, daß in verdünnter Lösung das $CaCl_2$ vollständig dissoziiert ist, so repräsentiert die Summe $CaCl_2 + a$ einfach den Gesamtgehalt der Ca-Ionen und die Gleichung lautet: $T . Ca^{\cdot\cdot} = $ Konst.

*) Unter der Annahme eines 0,6 ‰ $CaCl_2$ entsprechenden wirksamen Ca-Gehaltes der Milch.

Zu Versuch XV.



Eine Bestätigung dieses Resultats und somit der obigen Annahmen ist in der Tatsache zu erblicken, daß im Versuch XV die Berechnung aus allen drei Reihen mit ziemlicher Übereinstimmung denselben und zwar einen 0,6 ‰ $CaCl_2$ entsprechenden wirksamen Ca-Gehalt der Milch ergibt, wie aus der hinreichenden Konstanz der auf Grund dieser Annahme berechneten Zahlen $Ca^{\cdot\cdot}$: T zu entnehmen ist. Die Zahl selbst ist nicht unwahrscheinlich und würde besagen, daß nach Söldners Angaben etwa 60 Proz. der im Serum gelösten Kalksalze, also etwa 15 Proz. des gesamten Milchkalkes ionisiert ist. Die Konstanzzahlen aber verhalten sich natürlich dabei so wie die Labmengen, so daß auch $L . T . Ca^{\cdot\cdot} =$ Konst. gilt.

IV.

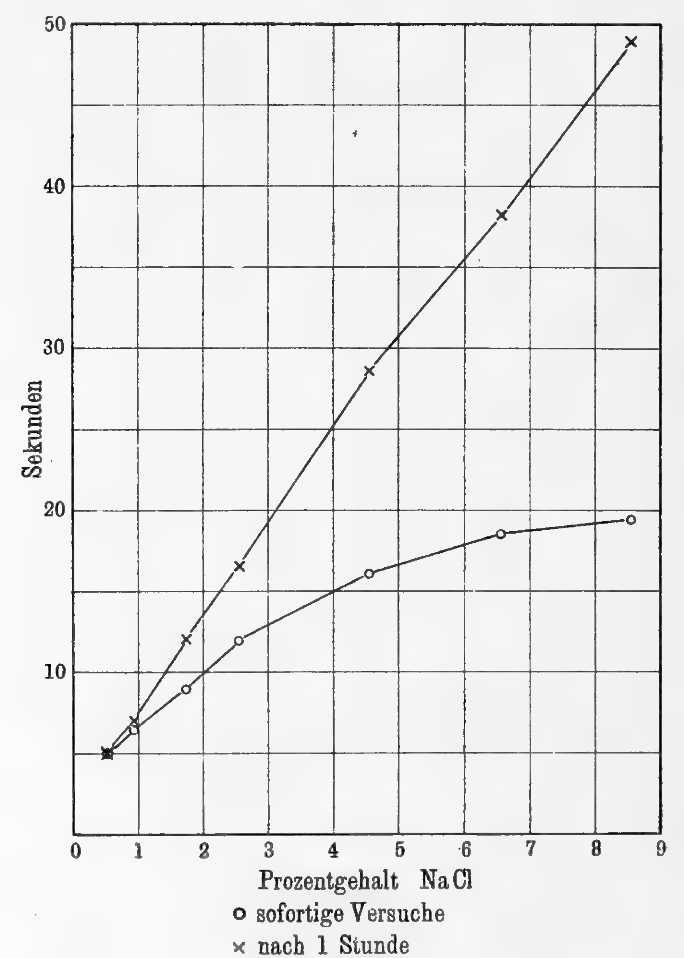
Für höhere $CaCl_2$-Konzentrationen hört, wie ebenfalls die Tabellen und Kurven zeigen, das obige Gesetz rasch zu gelten auf und macht dann einer allmählichen Zunahme der Gerinnungszeit mit steigendem Kalkgehalt Platz. Zur Erklärung dieser Ab-

weichungen dürfte folgendes heranzuziehen sein: Erstens ist anzunehmen, daß bei höherer Konzentration an Chlorcalcium der Grad der Ionisation abnimmt, zweitens — was für das Abfallen der Kurve wohl noch wichtiger — ist durch den Betrag der hier zugesetzten Kalksalzmengen die Isotonie gestört. Zur Erläuterung dieses Einflusses des osmotischen Druckes auf den Labungsprozeß seien hier die folgenden Versuchsprotokolle mitgeteilt. (XVI und XVII.)

XVI (Hypertonie).

Nr.	Milch	Lab	Na Cl Proz. C	Wasser	Zeit in Sekunden sofort	nach 1 Stde. T	Konstanzzahl (T−T') : (C−C')
1	2,5	0,5	0,5	ad 5 ccm	5	5	
2	"	"	0,9		6,5	7	5
3	"	"	1,7		9	12	5,83
4	"	"	2,5		12	16,5	5,75
5	"	"	4,5		16,5	28,5	5,875
6	"	"	6,5		18,5	38	5,5
7	"	"	8,5		19,5	49	5,5

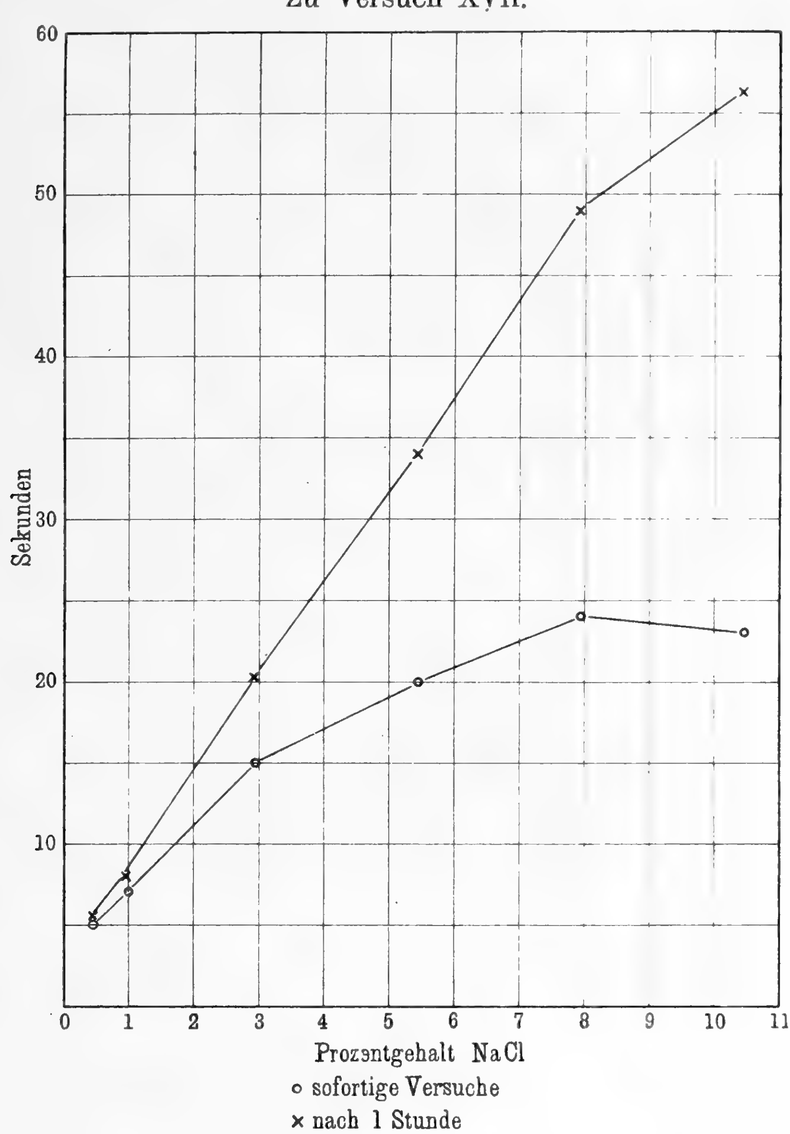
Zu Versuch XVI.



XVII (Hypertonie).

1	2,0	0,5	0,5	ad 5 ccm	5	5,5	
2	"	"	1,0		7	8	5
3	"	"	3,0		15	20,5	6
4	"	"	5,5		20	34	5,7
5	"	"	8,0		24	49	5,8
6	"	"	10,5		23	56	5,1

Zu Versuch XVII.



Wir haben durch steigenden Zusatz 20proz. Kochsalzlösung den osmotischen Druck variiert und dabei gefunden, daß eine unmittelbar nach dem Zusatz aufgenommene Kurve andere Werte gibt, als wenn wir erst eine Stunde nach dem Salzzusatz Lab zufügten. In beiden Fällen nahm die zur Labung verbrauchte Zeit zu, im letzteren war der Zeitzuwachs annähernd proportional der

Konzentrationssteigerung, wie aus der Konstanzzahl der Tabelle ersichtlich. Die Zeitwerte der ersteren Kurve waren niedriger, ein Unterschied, der mit steigendem Salzzusatz immer deutlicher wurde. Daß der osmotische Ausgleich zwischen Kolloiden und zugesetztem Salz meßbare Zeit beansprucht, haben wir, wie in anderem Zusammenhang gezeigt werden soll, auch bei der Aussalzung von Eiweißkörpern feststellen können.

XVIII (Hypotonie).

Nr.	Milch	Lab	Na Cl Proz. C	Wasser	Zeit in Sekunden sofort
1	2,0	0,5	0,45	ad 5 ccm	11
2	„	„	0,55		12,5
3	„	„	0,66		14
4	„	„	0,7		15
5	„	„	0,75		17
6	„	„	0,8		18
7	„	„	0,85		19
8	„	„	0,9		19
9	„	„	0,95		20

In schwach hypotonischen Lösungen findet (Versuch XVIII) eine der Hypotonie entsprechende Verkürzung der Gerinnungszeit statt, welche auch sofort zu beobachten ist. Die von Hammarsten beobachtete Verkürzung der Labungszeit durch geringen Wasserzusatz dürfte zum Teil auch hierauf zu beziehen sein.

V.

Wir haben oben wahrscheinlich gemacht, daß zwischen Zahl der Ca-Ionen und Zeitdauer die einfache Beziehung umgekehrter Proportionalität besteht. Wir wollen nun versuchen, dies zur Erklärung der Verdünnungsversuche anzuwenden. Wenn wir zunächst die mögliche Änderung der Ionisation der Kalksalze bei der Verdünnung vernachlässigen, so muß hier der Ca-Ionengehalt der Volumenvermehrung umgekehrt entsprechen, sein Verhältnis zum Kasein also gleich bleiben. Der Einfluß des $Ca^{\cdot\cdot}$ und der des Labs auf die Gerinnungszeit müssen sich also genau umgekehrt entsprechen und somit aufheben, wenn die absolute Konzentration der Ionen und das Verhältnis Lab zu Kasein als bestimmend betrachtet werden. In diesem Falle wäre der mit steigender Verdünnung zunehmende Zeitzuwachs (T'—T) auf eine von den Ca-Ionen unabhängige Wirkung der relativen Volumsvermehrung zurückzuführen. Wir

haben oben gezeigt, daß die Größen (T—T') und die Milchverdünnung nach der einfachen Formel $(T-T')\left(\frac{M}{V-M}\right) = \text{Konst.}$ von einander abhängen, somit wäre unter der obigen Voraussetzung die Verdünnungszeit auf relativ einfache Weise beschrieben.

Zu demselben Resultat bezüglich des Verdünnungsgesetzes würde man auch gelangen unter der veränderten Annahme, daß das Verhältnis Ca-Ionen zu Kasein und die Labkonzentration für die Zeit ausschlaggebend wären. Denn während sich oben die beiden Einflüsse genau aufheben, sind hier beide wirksame Faktoren ohne Einfluß, da sie innerhalb der Versuchsreihe gleich bleiben.

Eine Kombination beider Annahmen, daß sowohl für das Lab als auch für $Ca^{\cdot\cdot}$ die absolute Konzentration maßgebend sei, würde dazu führen, daß der Wert (T—T') als Funktion der Ca-Ionenkonzentration aufgefaßt werden müßte. Derselbe sollte aber dann nach den Ca-Versuchen einfach und gerade proportional der abnehmenden Milchmenge ansteigen, während er in den Verdünnungsversuchen tatsächlich der zunehmenden Milchmenge umgekehrt proportional ansteigt.

Die letzte denkbare Möglichkeit, daß nämlich die beiden Verhältnisse Lab zu Kasein und $Ca^{\cdot\cdot}$ zu Kasein bestimmend wirken, ergäbe die Notwendigkeit, nicht nur (T'—T), sondern auch die Summe dieses Werts plus einem der relativen Milchmenge proportionalen Anteil von T in Beziehung zur Milchverdünnung zu setzen, denn M : L würde eine der Milchmenge proportionale Abnahme, $Ca^{\cdot\cdot}$: M keine Veränderung innerhalb der Reihen erfahren. — Eine solche Erklärung erscheint möglich, doch verdient die erstere Annahme wegen der damit verbundenen Einfachheit der Darstellung — ceteris paribus — den Vorzug.

Die Molkenverdünnungsversuche wären so zu verstehen, daß der Ca-Ionengehalt der Labungsmolke neben den halbwegs beträchtlichen Milchmengen vernachlässigt werden kann, nicht aber mehr dort, wo in unsern Versuchen die Zeiten kürzer ausfallen als dem Gesetz entspricht (zwischen 10 und 6 Proz. Milchgehalt). Die umgekehrte Abweichung in sehr verdünnten Kochsalzversuchen dürfte auf eine geringe spezifische Hemmung zurückzuführen sein. Die gegen das Gesetz zu kurzen Zeiten, wie sie manchmal bei geringer Milchverdünnung auftreten, wären vielleicht am leichtesten als der Ausdruck einer geringfügigen Zunahme der Ionisation des Milchkalkes bei der Verdünnung zu verstehen, welche unter gewissen Umständen vielleicht die die Zeit verlängernden Momente zu überwiegen vermag.

VI.

Die im vorstehenden mitgeteilten Untersuchungen betrafen die Verschiebungen der notwendigen Komponenten des Labungsvorgangs: Kasein, Lab und Kalksalze; ihre Kenntnis erlaubt uns den Einfluß anderer Zusätze zu beurteilen.

Genauer wurden untersucht: Rhodankalium, Glycerin, Harnstoff, Glykokoll, Alkohol und Lecithin, nachdem auch der Zusatz einer größeren Zahl anderer Salze, wie Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumnitrat, Bromkalium, Natriumsulfat in einem Vorversuch (XIX) in Betracht gezogen war. Sie wurden alle in isotonischer Lösung verwendet und ihre Wirkung mit der von Molkenverdünnungen verglichen.

XIX.

Milch	Lab 50 %	Zeiten für Verdünnungsmittel 4 ccm									
		Molke	NaCl	KBr	$NaNO_3$	Na_2SO_4	CNSK	$CaCl_2$	$BaCl_2$	$MgCl_2$	$MgSO_4$
4,0	2,0	25	25	25	25	30	36	8	7	9	12

Wie der Versuch XIX zeigt, verkürzt Magnesiumchlorid die Labwirkung ganz ähnlich stark wie Calcium- und Baryum-Salze. Sulfate wirken — offenbar durch Ca-Bindung — hemmend oder ($MgSO_4$) weniger befördernd. Rhodankalium wirkt zeitverlängernd.

Wie Versuch XX zeigt und am besten aus den Kurven zu entnehmen ist, entspricht sowohl bei Kalksalzen als auch bei Rhodankalium der Verlauf der Zeit-Lab-Kurven der Vergleichskurve und somit dem üblichen Zeitgesetz: L . T = Konst. So konnte auch durch eine Mischung von Rhodankalium und Chlorcalcium ein Verdünnungsmittel hergestellt werden, das in seiner Wirkung vollkommen der Molke entsprach.

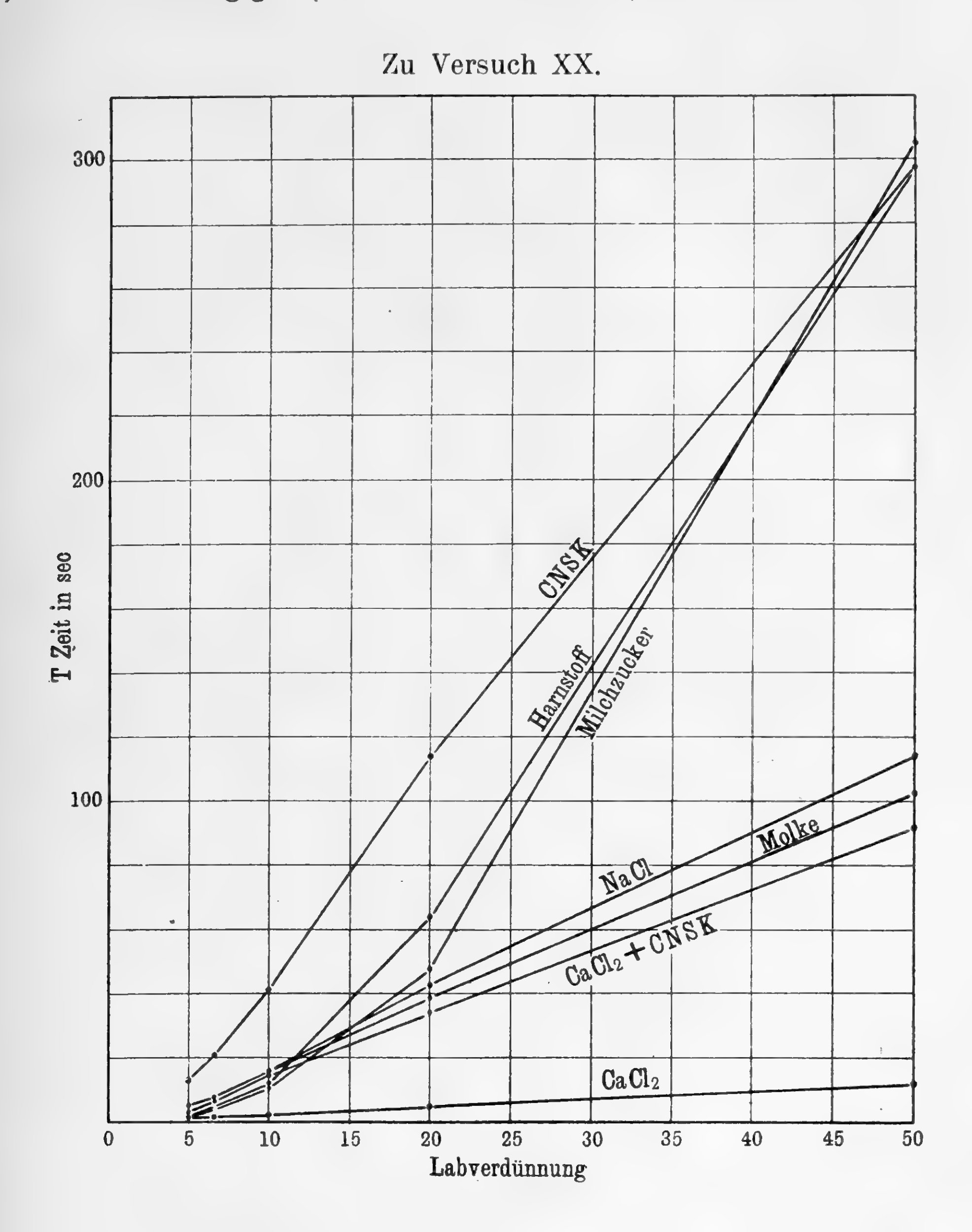
XX.

Nr.	Milch	Lab	Molke	Zeiten für Verdünnungsmittel 4,0 ccm					Milchzucker	Harnstoff
				Molke	NaCl	1 $CaCl_2$ 3 Molke	KCNS	0,5 $CaCl_2$ + 3,6 KCNS		
1	4,0	2,0	—	5	3	2	13	5	3	3
2	„	1,5	0,5	8	7	2	21	8	4	5
3	„	1,0	1,0	16	16	2,5	41	15	12	11
4	„	0,5	1,5	39	43	5	114	34	48	64
5	„	0,2	1,8	102	114	12	295	92	305	295

Ihnen reihen sich die hemmend wirkenden Glykokoll, Alkohol und Glycerin ebenso wie das schwach förderliche Lecithin an.

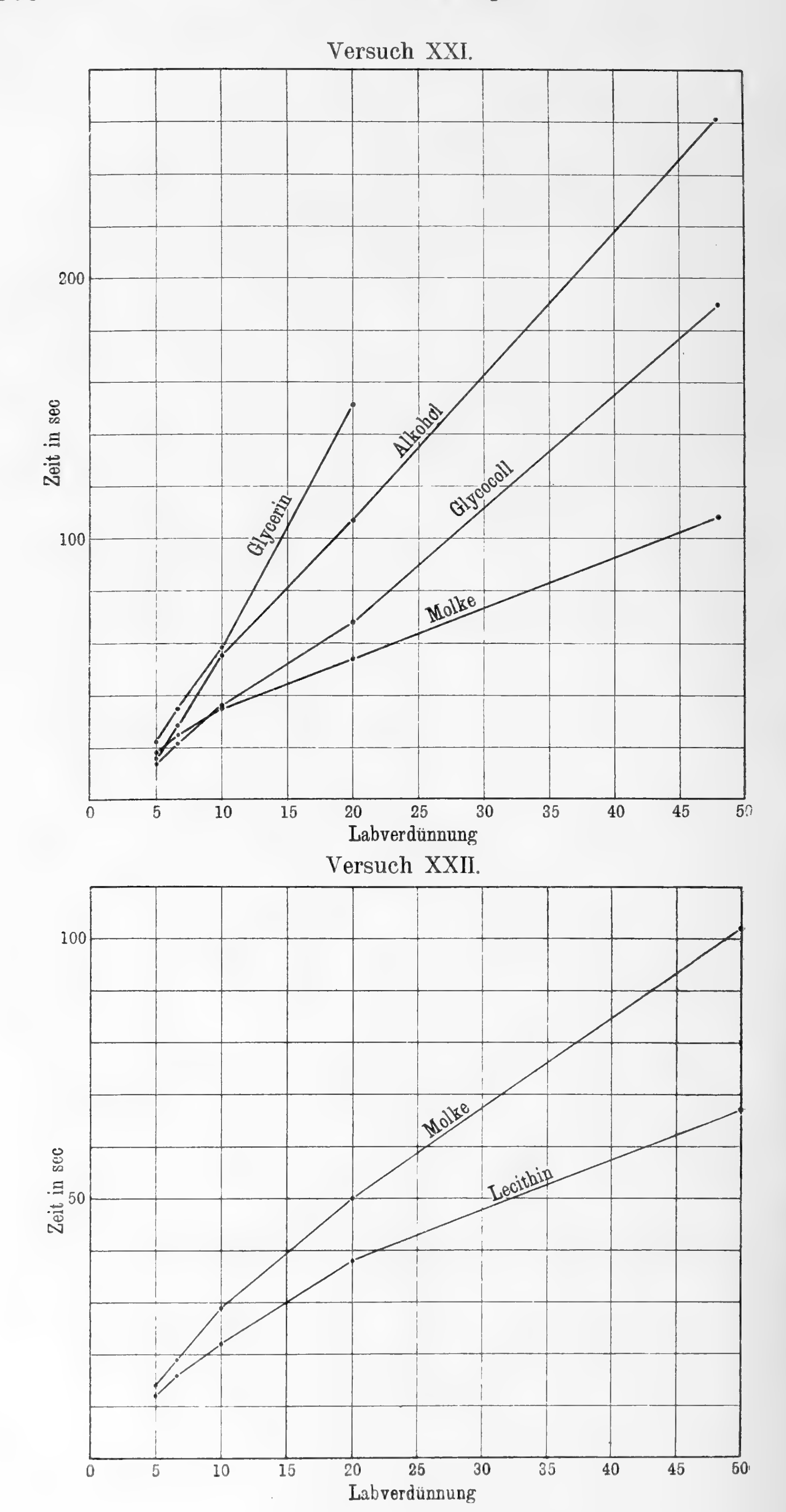
Die Wirkung aller dieser Stoffe ist im wesentlichen vom Labgehalt unabhängig. (Versuch XXI, XXII.)

Zu Versuch XX.



XXI. XXII.

Nr.	Milch	Lab	Molke	Zeiten für Verdünnungsmittel 4,0 ccm: Molke	Glykokoll	Alkohol	Glycerin	Molke + 1 % alkoh. Lecithinlös.	Molke + 1 % Alkohol
1	4,0	2,0	—	18	14	16	22	12	14
2	"	1,5	0,5	25	22	29	35	16	19
3	"	1,0	1,0	35	36	56	58	22	29
4	"	0,5	1,5	54	68	107	151	38	50
5	"	0,2	1,8	108	190	261	—	77	102


Versuch XXI.
Zeit in sec
200
100
Glycerin
Alkohol
Glycocoll
Molke
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Labverdünnung
Versuch XXII.
Zeit in sec
100
50
Molke
Lecithin
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Labverdünnung

Ganz anders verhalten sich die Zuckerarten und der Harnstoff. Hier wurde, wie aus der Kurve ersichtlich, die Funktion Lab zu Zeit nicht unwesentlich modifiziert, und zwar so, daß die Zeitwerte bei hoher Labkonzentration kleiner, bei niedriger Labkonzentration beträchtlich höher waren als für die Vergleichskurve. Die Kurve gewinnt so eine Form, die sich einmal besser durch $L^2 . T = \text{Konst.}$, als durch die gewöhnliche Gleichung darstellen läßt, bei einer anderen Verdünnung war der Exponent zu L gleich 1,47, so daß für diese Fälle die allgemeine Form des Zeitgesetzes lauten würde $L^n . T = \text{Konst.}$

Nach unseren Erfahrungen ist also der zu L gehörige Exponent variabel je nach den vorhandenen Lösungsgenossen; die einfachste Form des Zeitgesetzes, in der der Exponent gleich 1 ist, gilt in ausgezeichneter Weise für die in der Milch vorliegende Mischung und dieser zufällige Umstand bietet daher praktisch ein vorzügliches Mittel zur Abschätzung von Labquantitäten. Auf den theoretischen Wert des Gesetzes werden wir in der folgenden Mitteilung zurückkommen.

XXXI.

Über die Resorption des Lecithins aus dem Darmkanal.

Von Privatdozent Dr. **B. Slowtzoff.**

I.

Die Erfahrung am Krankenbette lehrt, daß die Darreichung von Lecithin per os ebenso günstig wirkt, wie die subkutane Darreichung, nur bedarf es größerer Gaben. Diese Beobachtung ist mit der verbreiteten Ansicht, daß das Lecithin im Darmkanal gespalten wird, schwer vereinbar. Diese Ansicht stützt sich auf die älteren Untersuchungen von Bókay und Hasebroek.

Bókay*) fand im Kote mit lecithinreicher Nahrung gefütterter Tiere kein Lecithin und schloß daraus auf dessen Spaltung im Darm.

Hasebroek**) untersuchte die Zersetzung des Lecithins durch Schlammbakterien. Es zerfiel rasch in Glycerinphosphorsäure, Fettsäuren und Cholin; letzteres wurde dann in Kohlensäure, Ammoniak und Methan übergeführt. Hasebroek schließt daraus, daß auch im Darmkanal eine Zerlegung des Lecithins in gleichem Sinne erfolgt.

Es leuchtet ein, daß diese Tatsachen die Frage nach der Resorption des Lecithins aus dem Darmkanal nicht entscheiden. Das Fehlen im Kot kann ebensogut durch Zersetzung als durch Resorption erklärt werden. Die Gleichstellung der Gärung durch Schlammbakterien mit den Vorgängen im Darmkanal ist in hohem Grade angreifbar. Selbst für den Fall, daß Magensaft und Pankreassekret das Lecithin spalten, ist damit nicht über das weitere Schicksal des Lecithins entschieden, da es im Organismus nachträglich ebenso gut wie die Fette durch Synthese zurückgebildet werden kann. Übrigens haben Stassano und Billon***) tatsächlich

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **1**, 157.
) Ebenda **12, 148.
***) Compt. rend. soc. biol. **55**, 482.

aktivierten Pankreassaft auf Lecithin und zwar auch nach 1 bis 3stündiger Behandlung mit Magensaft unwirksam gefunden.

Endlich wird Lecithin bei Anwesenheit von Galle und Albumosen leicht emulgiert. Es ist also möglich, daß diese Emulsion von Leukocyten aufgenommen und anderen Organen zugeführt wird. In der Tat hat Stassano gesehen, daß Leukocyten, die an den Ort einer subkutanen Lecithininjektion eingewandert waren, eine Granulation aufweisen, die ihrem Tinktionsvermögen nach dem Lecithin entsprach.

Die Vorstellung, die der Injektionstherapie zugrunde liegt, nämlich daß das Lecithin im Darmkanal zersetzt wird, kann demnach nicht als gesichert angesehen werden. Dies lehren auch neuere Versuche von Stassano und Billon*). Sie brachten Hunden Lecithin in Milch bei und untersuchten 5 bis 9 Stunden darnach die Lymphe des Ductus thoracicus. Sie extrahierten sie mit Äther-Alkohol und untersuchten den Verdampfungsrückstand mikroskopisch. Es fanden sich reichlich Globuliten, die das Polarisationskreuz zeigten. Hieraus wie auch aus der Bildung saurer Asche beim Verbrennen der Lymphe schlossen sie auf Übergang von unverändertem Lecithin in die Lymphe. Da nach Fütterung mit Eigelb nicht das gleiche Verhalten zu beobachten war, so sind Stassano und Billon geneigt, anzunehmen, daß das mit Eiweiß verbundene Lecithin entweder im Darmkanal weitergespalten wird oder auf anderem Wege zur Resorption gelangt.

II.

Zur Entscheidung der Frage habe ich einen ähnlichen Weg wie Stassano und Billon eingeschlagen, nur war ich bemüht, den Nachweis des unveränderten Lecithins und seiner Spaltungsprodukte auf exaktere Weise zu führen.

Die Versuchstiere (Hunde) erhielten Eidotter oder Lecithin, die Kontrolltiere Butter oder Schmalz. Die 4 bis 5 Stunden später in Hedonal-Chloroform-Narkose entnommene Lymphe wurde auf ihren Lecithingehalt untersucht. Bei günstiger Lage des Ductus thoracicus wurde die Kanüle in ihn eingebunden; wenn dies nicht tunlich war, habe ich die Venae anonymae unterhalb der Einmündungsstelle und alle oberhalb einmündenden Venen unterbunden, und die Lymphe, die aus dem Venenstück zwischen den Ligaturen ausfloß, gesammelt.

*) Compt. rend. soc. biol. **55**, 924.

Die gewonnene Lymphe wurde mit starkem Alkohol versetzt, der Niederschlag abfiltriert, Filtrat und Niederschlag bei 50 bis 60° eingetrocknet. Die Rückstände wurden vereinigt, im Soxhletschen Apparat mit wasserfreiem Äther ausgezogen, dann mit 95proz. Alkohol ausgekocht. Äther und Alkoholextrakt wurden bei 50° zur Trockne gebracht und mit Aceton behandelt. Fette, Fettsäuren und die Spuren von Alkaliphosphaten, die aus der Lymphe in das Alkoholextrakt übergehen, wurden vom Aceton aufgenommen, während die Hauptmasse des Lecithins ungelöst blieb. Der Rückstand wurde abfiltriert, in Äther gelöst, die Lösung qualitativ und quantitativ auf Phosphor und Stickstoff untersucht.

Von den mir vorliegenden 8 Versuchsprotokollen seien die folgenden 4 als Beleg mitgeteilt.

Versuch vom 3. XI. 1904. Hund, 12,5 kg schwer, seit 24 Stunden nüchtern. Erhielt 100 g Fett und 700 ccm Milch. Nach 5 Stunden 25 g Chylus entnommen. Ätherextrakt daraus enthält weder Phosphor noch Stickstoff.

Versuch vom 17. IX. 1904. Hund, 12,3 kg schwer. 200 g Butter und 700 ccm Milch. Nach 5 Stunden 50 ccm Lymphe entnommen. Ätherextrakt enthält Spuren Phosphor, die aber anorganischer Natur sind, da die Acetonbehandlung kein Lecithin ergibt, und Stickstoff im Ätherextrakt fehlt.

Versuch vom 20. XII. 1904. Hund, 13,5 kg schwer. Erhält etwa 4 g Lecithin (in eingedampftem Eidotterätherextrakt) und 700 g Milch. Aus den nach 5 Stunden entnommenen 50 ccm Chylus wurde eine Ätherlösung erhalten, die 0,0126 g P_2O_5 ergab. Nach dem Reinigen mit Aceton erwies sich der unlösliche Teil als in Äther, Chloroform und heißem Alkohol löslich und stickstoffhaltig.

Versuch vom 23. XII. 1904. Hund, 10,2 kg schwer. Erhält 4 g Lecithin, etwa 100 g Fett und 700 ccm Milch. Aus der nach 5 Stunden entnommenen Lymphe wurde ein ätherlösliches Produkt erhalten, das 0,084 g P und 0,036 g N enthielt. Das Verhältnis von P : N war 2,4, während es im Lecithin 2,2 ist. Die Löslichkeitsverhältnisse entsprachen jenen des Lecithins. Im eingedampften Ätherextrakt fanden sich doppelbrechende Klümpchen.

Die anderen 4 Versuche ergaben gleiche Resultate.

Ich glaube somit bewiesen zu haben, daß nach Lecithindarreichung beim Hunde in der Lymphe des Ductus thoracicus eine Substanz vom Verhalten des Lecithins auftritt.

III.

Es war nun zu untersuchen, ob das eingeführte Lecithin als solches oder in Form seiner Spaltungsprodukte durch die Darmwand geht. Zu diesem Zwecke wurde der Darminhalt von Hunden nach Lecithinzufuhr auf unverändertes Lecithin, auf Cholin und Glycerinphosphorsäure untersucht.

Die Untersuchung auf Lecithin geschah wie oben. Um Cholin und Glycerinphosphorsäure nachzuweisen, wurde die fermenthaltige Lecithinemulsion bei 40 bis 50° auf dem Wasserbad eingetrocknet und der Rückstand mit salzsäurehaltigem Aceton extrahiert, die Acetonlösung abfiltriert, neutralisiert, bei 40° zur Trockne gebracht, der Rückstand in Wasser gelöst, abfiltriert und mit Krauts Reagens (Jodwismutkalium) gefällt. Nach 10 bis 12stündigem Stehen wurde der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, mit Silberoxyd zersetzt, mit Alkohol extrahiert, das Cholin daraus mit alkoholischem Platinchlorid gefällt. Das Filtrat der Fällung mit Krauts Reagens wurde eingedampft, angesäuert, mit Alkohol extrahiert, im Alkoholextrakt der Phosphor bestimmt.

Versuch X. Ein Hund erhält rund 6 g Lecithin (aus Eigelb). Nach 7 Stunden wird er getötet, der Darmtrakt unterhalb des Magens, des Duodenums und des Anfangs des Dickdarms abgebunden.

Der stark sauer reagierende und sehr fermentreiche Mageninhalt, der noch einen erheblichen Teil der eingeführten Nahrung darstellte, enthielt weder freies Lecithin, noch Cholin, noch Glycerinphosphorsäure.

Im Duodenum wurden Spuren von Lecithin, Cholin und Glycerinphosphorsäure gefunden. Im übrigen Dünndarm weder Lecithin, noch Cholin, noch Glycerinphosphorsäure.

Der viermal in gleicher Weise wiederholte Versuch ergab stets das gleiche Resultat, obgleich die Zeit der Tötung des Tieres nach der Mahlzeit wechselte. Als leicht zu vermeidende Fehlerquelle ergab sich die Anwesenheit von Lecithin im Schleimhautepithel. Wird der Darminhalt kräftig abgepreßt, so kann eine so reichliche Epithelbeimengung erfolgen, daß der Darminhalt Spuren von Lecithin aufweist, während er in Wirklichkeit lecithinfrei ist.

Diesen Erfahrungen zufolge wird das Lecithin im Duodenum gespalten, es scheinen aber alle Spaltungsprodukte gleichmäßig zu verschwinden. Daß diese Spaltung durch Bakterien erfolgt, ist bei der fast völligen Abwesenheit von Fäulnis an dieser Stelle nicht anzunehmen. Ich habe daher die Versuche von Stassano und Billon über die Einwirkung von Pankreassaft auf Lecithin nachgeprüft.

0,5 g frisch bereitetes Lecithin wird mit 100 ccm 0,3proz. Sodalösung und 10 ccm starken künstlichen Pankreassaftes vermischt, die Flüssigkeit mit Thymol versetzt, halbiert, die eine Hälfte als Kontrollprobe aufgekocht. Nach 24stündiger Digestion in keiner Probe freies Cholin. Bei Titration der Fettsäuren ist die Kontrollprobe unverändert, die Fermentprobe sauerer.

0,3 g eines älteren dunkel gewordenen Merckschen Lecithinpräparates ebenso behandelt, wie im vorigen Versuch. Nach 24stündiger Digestion wird in der gekochten und ungekochten Fraktion Cholin gefunden. Doch enthielt schon das Ausgangspräparat abgespaltenes Cholin.

0,5 g eines 3 Jahre alten, Spuren Cholin enthaltenden Lecithinpräparates eigener Darstellung wie oben behandelt. Sowohl die gekochte als die ungekochte Probe zeigen eine Vermehrung des Cholins.

0,3 g frisch dargestelltes Lecithin mit sehr aktiver Trypsinlösung zusammengebracht zeigte nach 24stündiger Digestion bei 40° keine Veränderung.

0,3 g frisch dargestelltes Lecithin wird mit stark wirksamem, aus einer Pawlowschen Fistel nach Milchzufuhr erhaltenem Pankreassaft zusammengebracht. Nach 24stündiger Digestion kein Cholin, wohl aber Zunahme freier Fettsäuren nachweisbar.

Darnach scheint bei dem Lecithinabbau die Abspaltung des Cholins und die Abspaltung der Fettsäuren unabhängig von einander zu erfolgen. Schwach alkalische Reaktion und eine Temperatur von 40° scheinen schon an sich zur Abspaltung von Cholin, wenigstens aus alten Lecithinpräparaten zu genügen. Steapsin scheint vor allem die Abspaltung von Fettsäuren zu bewirken. Frisch bereitetes Lecithin wird, wie schon Stassano und Billon fanden, von Pankreassaft nicht angegriffen.

Nach dem Gesagten wird Lecithin nach Darreichung per os von Fermenten und Bakterien lange nicht so rasch zerlegt als man früher gedacht hat.

Da Drosdoff*) vor langer Zeit angegeben hat, daß Pfortaderblut lecithinreicher sei als das Blut peripherer Venen, konnte an eine Resorption des Lecithins durch die Blutbahn gedacht werden.

Ein paar Kaninchen erhielten nach 24stündiger Karenz lecithinreiche Nahrung. 4 bis 5 Stunden später wurde Blut aus Pfortader und Vena femoralis entnommen und der Lecithingehalt darin sowie in der Leber ermittelt. Die Unterschiede waren jedoch zu klein und zu wechselnd, um zu bestimmten Schlüssen zu berechtigen.

IV.

Im Anschluß an diese Untersuchungen habe ich einige Versuche über Resorption von Lecithalbumin ausgeführt.

Aus Eidotter stellte ich mir nach Osborne und Campbell**) Lecithalbumin dar, das eine beträchtliche Menge durch siedenden Alkohol abspaltbaren Lecithins enthielt. Etwa 5 g davon wurden mit natürlichem Magensaft im Brutschrank digeriert. Nach 24 Stunden war das Eiweiß gelöst. Die Lösung wurde filtriert und neutralisiert, das ausgefallene Acidalbumin auf dem Filter gesammelt, mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Auskochen mit starkem Alkohol extrahierte daraus eine ölige phosphor- und stickstoffhaltige Substanz, die sich nach ihren Lösungsverhältnissen als Lecithin erwies. Das Filtrat vom Acidalbumin wurde mit einem Volum starken Alkohols gefällt, der Niederschlag, aus primären Albumosen bestehend, auf dem Filter mit kaltem Alkohol und Äther ausgewaschen. Er gab an siedenden Alkohol kein Lecithin ab. Ebenso wenig fand sich solches im Albumosenfiltrat.

Der Versuch gab bei vierfacher Wiederholung dasselbe Resultat.

Das Lecithalbumin wird somit bei Einwirkung des Magensafts gespalten. Im Stadium des Acidalbumins ist aber das

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **1**, 223.

) Journ. Am. Chem. Soc. III, **22, 413 (1900).

Lecithin noch an Eiweiß geknüpft. Das scheint mir wichtig, da es denkbar wäre, daß das Lecithalbumin als solches zur Resorption kommt. Ich habe einige Versuche mit Einführung von Lecith-acidalbumin per rectum angestellt und Verschwinden desselben beobachtet. Wenn dies auch nach Darreichung von Lecithalbumin stattfindet — was noch nicht als entschieden anzusehen ist — so wäre eine Resorption von durchaus intaktem Lecithin auf diesem Wege denkbar.

Die Resultate meiner Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die gangbare Vorstellung, wonach das Lecithin im Darmkanal durch Fermente und Bakterien zersetzt wird, geht zu weit, ein Teil des Lecithins der Nahrung geht nachweisbar in die Lymphe über.

2. Das Lecithin wird durch Pankreassaft und zwar durch das Steapsin verseift. Eine Abspaltung des Cholins tritt bei frischen Lecithinpräparaten nicht ein, wohl aber bei durch die Aufbewahrung veränderten. In diesem Fall erfolgt sie aber auch durch gekochte alkalische Fermentlösung.

3. Lecithalbumine werden durch Pepsinsalzsäure verändert. Im zuerst gebildeten Acidalbumin scheint das Lecithin noch an Eiweiß gebunden zu sein und kann (bei Darreichung per rectum) in dieser Form zur Resorption kommen.

XXXII.

Über die Verteilung der Salicylsäure bei normalen und infizierten Tieren.

Von Dr. Samuel Bondi und Dr. Martin Jacoby.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.

Seit den Arbeiten von Ehrlich, E. Ludwig, Hofmeister, Pohl, Spiro, H. Meyer und Overton ist es allgemein anerkannt, eine wie große Bedeutung die Verteilungsgesetze der in den Organismus eingeführten Substanzen für das Verständnis physiologischer und pathologischer Vorgänge haben. In pharmakologischer und therapeutischer Beziehung ist es von Interesse, festzustellen, ob bestimmte Stoffe zu den einzelnen Organen eine besondere Affinität besitzen und inwieweit diese Affinität von dem physikalischen Verhalten und der chemischen Konstitution der Substanz abhängig ist. Wie Ehrlich*) in seinem 1902 erschienenen Vortrage aufs schärfste ausführt, ist es kein Zufall, daß solche Untersuchungen trotz ihrer Wichtigkeit bisher nur wenig gepflegt wurden. Bei den meisten Substanzen bietet der quantitative Nachweis zu große Schwierigkeiten. Ehrlich erkannte, daß sich bedeutsame Resultate gewinnen lassen, wenn man für Verteilungsstudien die Farbstoffe verwertet. Versuche über die Verteilung von Farbstoffen im Organismus lassen sich verhältnismäßig leicht ausführen und gewähren daher ziemlich schnell einen guten Überblick über grundlegende Fragen. Oft ist die Verteilung einer Substanz dann durch die Intensität der Färbung der einzelnen Organe direkt sichtbar oder es bedarf nur eines geringen chemischen Eingriffes, um den wenig veränderten Farbstoff zu regenerieren. Will man die Verteilung eines Stoffes bis in die histologischen Strukturen hinein verfolgen, so ist man bisher ausschließlich auf die Farbmethoden angewiesen.

*) Festschrift für Leyden 1902 u. i. Gesammelten Arbeiten 1904.

Natürlich hat aber auch die Anwendung der Farbstoffe für Verteilungsstudien ihre Grenzen. Wenn die Farben mit reaktionsfähigen Bestandteilen der Organe farblose Verbindungen eingehen, so wird die Inspektion keinen Aufschluß liefern. Für manche Fragen kann man in diesem Verhalten einen Vorzug erblicken, da man einen Einblick in die Reaktionsfähigkeit der Organe erlangt, für andere Fragen wird dieser Punkt belanglos sein. Öfters ist jedoch wünschenswert, ein vollständiges Bild der Verteilung zu gewinnen, und sich darüber Klarheit zu verschaffen, welche Substanzmengen in den einzelnen Organen deponiert sind. Hierzu ist eine chemische Aufarbeitung der Organe auf ihren quantitativen Gehalt an der betreffenden Substanz nötig. Man wird dabei vorläufig noch die Verteilung in die einzelnen Gewebselemente vernachlässigen müssen. Auf die angedeutete Methode der Untersuchung ist man z. B. angewiesen, wenn man die Verteilung wichtiger Arzneimittel untersuchen will.

In dieser Arbeit haben wir uns mit der Verteilung der Salicylsäure beschäftigt, aus dreierlei Gründen: Einmal war Aussicht vorhanden, verhältnismäßig einfach ihre Gegenwart festzustellen; dann aber konnte man hoffen, vom Standpunkte der Konstitution und Wirkung von der Verteilung der Salicylsäure aus die Verteilung der ihr nahestehenden Verbindungen zu prüfen. Auf diesem Wege wird es vielleicht gelingen, zu erfahren, welche konstitutiven Eigenschaften der Salicylsäure ihre Verteilung bedingen. Schließlich schien es uns wichtig, bei Verteilungsversuchen die Salicylsäure zu berücksichtigen wegen ihrer so spezifischen Wirkung bei ganz bestimmten Infektionen und bei den Erkrankungen bestimmter Organe.

In der Literatur haben wir folgende Angaben gefunden: Zunächst eine Angabe von Nencki aus dem Jahre 1895, daß Salicylsäure in die Galle, aber nicht in den Magensaft ausgeschieden wird. Sodann aus demselben Jahre Angaben über die Verteilung der Salicylsäure von Suck*) in einer unter Nencki angefertigten Dissertation; wir geben hier das in den gesammelten Arbeiten von Nencki sich findende Referat:

Verfasser untersuchte die Verteilung der Anilidmethylsalicylsäure, der α-Oxyuvitinsäure, des α-Oxyuvitinsäureäthyläthers und der Salicylsäure und legte auf die letztere das Hauptgewicht. Zu den Versuchen dienten Kaninchen, Katzen, Hunde; sie erhielten Salicylsäure oder salicylsaures Natrium per os oder subkutan in Mengen von 0,5 bis 1,5 g pro kg Körper-

*) Nencki, Archiv f. exper. Path. u. Pharmak. **36**, 400 (1895) u. Suck, Über das Verhalten und die topographische Verteilung einiger aromatischen Verbindungen im Tierkörper. Inaugural-Dissertation Dorpat 1895. Beide Arbeiten zitiert nach Marcelli Nencki Opera omnia **2**. Braunschweig, Vieweg 1905, S. 548 bis 550.

gewicht. Nach etwa 4 Stunden tötete man das Tier, indem man das Blut durch die Art. carotis herausließ, und wusch die Leiche durch die Aorta ascendens und descendens mit einer Lösung von 2 Proz. Rohrzucker und 0,6 Proz. Kochsalz so large aus, bis die durch die Vena cava herausfließende Flüssigkeit vollständig farblos wurde. Einzelne Organe wurden mit Sand verrieben und unmittelbar mit Äther extrahiert; manchmal wurden sie vorher mit Salzsäure angesäuert. Der Äther wurde abgegossen, abgedampft, nach Befreiung von HCl mit $FeCl_3$ behandelt. Es zeigte sich, daß man die Anwesenheit von Salicylsäure in sämtlichen Organen konstatieren konnte. Das Gehirn und Pankreas müssen vorher angesäuert werden, damit nachher eine Färbung mit Eisenchlorid beobachtet werden kann; im Blute gelang es ebenfalls nicht immer, die Anwesenheit von Salicylsäure ohne vorheriges Ansäuern zu konstatieren.

Filippi*) teilt mit, daß „ein Teil der Salicylsäure in die Synovia der Gelenke ausgeschieden wird, was die Wirkung auf den Rheumatismus erklärt. Auch Gehirn und Rückenmark entziehen Salicylsäure.

Nach Filippi und Nesti**) „konnte per os dargereichtes Aspirin bei Kaninchen nach einer Stunde in der Gelenkflüssigkeit durch die Salicylsäurereaktion nachgewiesen werden, im Harn fand sich Salicylsäure noch nach 77 Stunden. In fünf Fällen beim Menschen wurde das erkrankte Kniegelenk 2 Stunden nach der Einnahme von 4 × 0,5 g Aspirin punktiert und in der Gelenkflüssigkeit stärkere Reaktion erhalten als im Harn. In die Ascitesflüssigkeit ging es nur in Spuren über, im Speichel fehlte es ganz.“

In neuester Zeit hat Vinci***) über die Frage folgendes mitgeteilt:

„Im Organismus kann salicylsaures Natrium in allen Organen und Flüssigkeiten nachgewiesen werden, doch enthalten die Sekretionsorgane (Nieren, Leber, Magendarmschleimhaut) und Blut eine verhältnismäßig größere Menge davon als die anderen Organe (Gehirn, Milz, Muskeln u. s. f.). Die üblichen Dosen Salicylsäure zeigen eine elektive Wirkung auf die Elemente des Blutes, mit denen sie eine verhältnismäßig feste Verbindung eingehen. Im Nervensystem wird die Salicylsäure nur nach Darreichung großer Gaben vorgefunden.“

Nach Arnozan und Montel†) nehmen die Leukocyten Natrium salicylicum auf.

Wir können darauf verzichten, zu analysieren, inwieweit diese Angaben verwertbar sind. Da wir vielfach über die benutzte Methodik nicht orientiert sind, würde der Versuch einer kritischen

---

*) La Clinica moderna 1900, Nr. 7, zitiert nach Kobert, Intoxikationen.

**) Allgem. mediz. Zentralz. 71, Nr. 52, zitiert nach Malys Jahresbericht 1902.

***) Vinci, G. (Pharmak. Inst. Messina) — Sulla dose tossica, sulla diffusione nell' organismo e sull' azione biologica dell' acido salicilico (Über die toxische Dosis, die Verteilung im Organismus und die biologische Wirkung der Salicylsäure). Arch. di farmac. sperim. e scienze aff. 2, H. 7, zitiert nach Biochem. Zentralbl. 3, Nr. 15 (Februar 1905).

†) Internation. Ärztekongreß, Paris 1900, zitiert nach Metschnikoff, Immunität bei Infektionskrankheiten. Jena 1902, S. 321.

Besprechung von vorneherein aussichtslos sein. In mühsamen Vorversuchen, die uns ein ganzes Wintersemester beschäftigt haben, haben wir uns nämlich davon überzeugt, daß es nicht ganz leicht gelingt, den Organen die Salicylsäure vollständig zu entziehen, ohne sie bei der Darstellung teilweise zu zerstören. Auch bedarf es besonderer Maßnahmen, um schließlich zu einer Flüssigkeit zu gelangen, die für kolorimetrische Vergleiche geeignet ist. Es ist dazu nötig, gewisse Substanzen zu entfernen, welche die Reaktion der Salicylsäure mit dem Eisenchlorid stören.

Um Salicylsäure aus den Organen völlig zu extrahieren, genügt es nicht, wie etwa zum qualitativen Nachweis, die zerkleinerten Organe in Wasser zu koagulieren und die Koagula gut auszuwaschen. In methodischen Versuchen konnten wir oft noch beträchtliche Mengen im Filterrückstande nachweisen. Von Salicylsäure freie Rückstände erhielten wir erst, als wir in der unten beschriebenen Art Kochen mit Säure und Alkoholextraktion kombinierten. Das gleiche war auch notwendig zur Extraktion der Abdampfrückstände aus den Filtraten und Waschflüssigkeiten.

Zur Vermeidung größerer Verluste beim Kochen sind diese Rückstände vorher mit saurem Alkohol zu erschöpfen. Neutraler Alkohol läßt in den alkalischen Abdampfrückständen oft ziemliche Mengen Salicylsäuresalz zurück. Ein kleiner Rest Salicylsäure kann immer erst durch Säurekochung gewonnen werden. Um Substanzen zu entfernen, welche in den alkoholischen Auszug mit übergehen und die Eisenchloridreaktion stören, ist es nötig, eine Behandlung mit Bleiacetat an der wässerigen Lösung des Rückstandes vorzunehmen, welcher nach dem Eindampfen des alkoholischen Extraktes entsteht.

Weitere Kontrollversuche lehrten uns, daß bei der Ausführung unserer Methode keine oder nur sehr geringe Verluste an Säure vorkommen können. Wir stellten dies fest, indem wir von einer Lösung von Salicylsäure zu den verschiedenen Organen die gleiche Menge hinzugaben. Die Eisenchloridreaktion war nach Ausführung der Methode in der wässerigen Lösung der Ätherextrakte in allen Organen gleich stark und von der Reaktion in der Vergleichslösung kaum merkbar verschieden. Eine derartige Herabminderung der Verluste gelang erst, als wir die Zeit der Säurekochung wie die Konzentration an Säure auf das unten angegebene Maß beschränkten. Es spricht außerdem manches dafür, daß bei Zusatzversuchen die Verluste größer sind, während bei der noch unbekannten Bindung der Salicylsäure in den Organen eines mit Salicylsäure vergifteten Tieres

dieselbe vor der Schädigung durch die heiße Säure besser geschützt scheint.

Die weiterhin in den Tabellen angeführten Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt.

Die parenchymatösen Organe wurden zerkleinert, und sodann wie die andern Organe oder Körperflüssigkeiten je mit 100 ccm Wasser und 10 ccm einer verdünnten, ungefähr fünffach normalen Schwefelsäure 10 Minuten an langen Rückflußkühlern gekocht. Der saure, wässerige Organbrei kam warm in 200 ccm gewöhnlichen Alkohols, zu welchem dann noch 100 ccm hinzukamen, mit denen Rückflußkühler und Kochkolben ausgespült worden waren. Das Ganze blieb unter öfterm Umrühren und Zerkleinern größerer Organstückchen bis zum andern Tage stehen; dann wurde die Hauptmenge der Säure mit Alkalilauge neutralisiert, mit Soda schwach alkalische Reaktion hergestellt, schließlich filtriert und mit viel Wasser nachgewaschen. Filtrate und Waschwasser wurden vereint und völlig auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand wurde zunächst mit 50 ccm Alkohol, dem 2 ccm der verdünnten Schwefelsäure beigegeben waren, verrieben, der saure Alkohol wurde durch ein Filter abgegossen. Der Rückstand wurde noch einmal mit gewöhnlichem Alkohol gewaschen und sodann in Kölbchen gebracht. Die Abdampfschalen wurden mit 20 ccm Wasser, die 1 ccm der verdünnten Schwefelsäure enthielten, ausgewaschen, die saure Flüssigkeit kam zu dem Rückstande in den Kölbchen, und wurde mit diesen am Rückflußkühler einmal aufgekocht, und darnach durch diesen mit 100 ccm Alkohol versetzt. Zur besseren Extraktion wurde wieder längere Zeit stehen gelassen, dann wurde filtriert, mit Alkohol ausgewaschen. Diese alkoholischen Flüssigkeiten wurden mit den früheren sauren alkoholischen Extrakten des Abdampfrückstandes vereinigt, mit Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und eingedampft. Der neuerliche Abdampfrückstand wurde in 20 ccm Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen ganz verdünnter Schwefelsäure bis zur eben sauren Reaktion versetzt und nun mit 1 ccm einer verdünnten Bleizuckerlösung — etwa 1 proz. — gefällt. Sodann wurde filtriert und dreimal mit kochend heißem Wasser nachgewaschen. Die Filtrate wurden stärker angesäuert und dreimal im Schütteltrichter mit Äther extrahiert. Der Äther wurde in Schalen an der Luft bei Zimmertemperatur verflüchtigt.

In den Schalen blieb gewöhnlich ein ungefärbter, oft garnicht sichtbarer Rückstand, bei höherem Gehalt an Salicylsäure waren mitunter feine Nadeln sichtbar. Besonders während der warmen Jahreszeit hatte sich in den Schalen auch etwas Wasser aus der Luft kondensiert. Um gut vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde nun aus jeder Schale das Kondenswasser in ein eigenes Meßzylinderchen gegeben, bis zur Marke 3 mit Wasser aufgefüllt. Diese 3 ccm wurden aufgekocht und sofort heiß in die Schalen geleert. Die Innenwand der Schalen wurde möglichst überall mit der heißen Flüssigkeit in Berührung gebracht, aus jeder Schale wurde sodann 1 ccm in kleinen Proberöhrchen mit Eisenchlorid geprüft.

War wegen größeren Salizylsäuregehaltes die Reaktion in allen Röhrchen stark und nicht unter einander vergleichbar, so wurden von allen Schalen gleichmäßig je 1 ccm in Meßzylinderchen weiter verdünnt und nach gutem Mischen von den erhaltenen Flüssigkeiten neue Proben angestellt.

Bei Muskel entstand einmal nach Eisenchloridzusatz eine rein gelbe Färbung, trotz sicheren Salicylsäuregehaltes. Es stellte sich heraus, daß

vor dem Verarbeiten die Muskeln über Nacht gelegen hatten, wobei sich viel Milchsäure gebildet hatte. Bei Verarbeitung der Muskeln baldigst nach der Entnahme aus dem Tierkörper hatten wir ähnliches nie beobachtet. Öfters waren die Farbentöne bei Muskeln und Gelenk nicht so rein violett, sondern hatten einen gelblichen Stich. Daß dabei nicht Salicylsäure verdeckt wurde und der Reaktion entging, darüber hatten uns die erwähnten Kontrollversuche belehrt.

Als Versuchstiere wurden stets Kaninchen benutzt. Aus später ersichtlichen Gründen war ein Teil der Tiere mit Bakterien infiziert. Neben der Salicylsäure wurde in einigen Versuchen salicylsaures Natrium, Aspirin und Amidosalicylsäure verwendet. Die Substanzen wurden entweder als Emulsion mit Gummi arabicum mit der Schlundsonde in den Magen gebracht oder subkutan injiziert

Die Tiere wurden 1 bis 24 Stunden nachher durch Verbluten aus der Carotis getötet. Durch Anwendung künstlicher Atmung und intermittierender Kompression der Bauchorgane wurde meistens eine ziemlich gute Entleerung erzielt. Die Organe wurden sofort herausgenommen, aufs vorsichtigste wurde jede Berührung mit dem Harn vermieden. Die Muskeln wurden in der Hauptsache von den hintern Extremitäten entnommen, als Gelenke zumeist die beiden Kniegelenke der hintern Extremitäten benutzt, die möglichst vollständig muskelfrei präpariert wurden. Als Röhrenknochen wurden die Diaphysen aller Extremitäten und zwar das Knochengewebe und das Mark zusammen verarbeitet.

Das Blut wurde zentrifugiert und zumeist das Serum zur Untersuchung genommen.

Im Anfang wurde die Untersuchung auf viele Organe und wie schon erwähnt, auf mehrere Substanzen und verschiedene Applikationsweisen ausgedehnt. Allmählich erwies sich eine Beschränkung auf die Salicylsäure, ihre Zufuhr per os und die Untersuchung von nur vier Organsystemen notwendig, einmal weil die Ausbildung der Methodik die Versuchsanordnung komplizierte, dann aber auch, weil ganz bestimmte Fragestellungen zunächst eine sichere Beantwortung wünschenswert machten. Die Resultate, welche sich aus den früheren noch nicht begrenzten Versuchen mit Sicherheit als Nebenbefunde ableiten lassen, werden wir zum Schluß in einem besondern Abschnitt kurz zusammenstellen.

In den beiden folgenden Tabellen sind die unserer Versuche übersichtlich zusammengestellt, welche genau nach der angegebenen Methode ausgeführt wurden.

In der Kolonne „Zeit“ ist angegeben, wie viele Stunden nach der Salicylsäureeingabe die Tiere getötet wurden. Alle Tiere erhielten 0,75 g Salicylsäure in Emulsion mit der Schlundsonde. Bei der zweiten Tabelle, den mit Staphylococcus aureus infizierten Tieren, ist noch die Gewichtsabnahme der Tiere nach der Infektion bis zur Verblutung, wie die Zahl der zwischen diesen beiden liegenden Tage — „Krankheitsdauer“ — gekennzeichnet. Unter „Endgewicht“, in der ersten Tabelle „Tiergewicht“, ist das Gewicht am Tage der Salicylsäureeingabe verstanden. Weiterhin sind die Mengen ersichtlich, welche von den einzelnen Organen in Verwendung gezogen wurden, sowie der Ausfall der Eisenchloridreaktion in 1 ccm der Flüssigkeit, welche durch Ausspülen der Ätherschalen mit 3 ccm heißen Wassers erhalten war.

Wurde ein weiterer Kubikzentimeter dieser Flüssigkeit verdünnt, so ist in der Kolonne Verdünnung die Größe derselben angedeutet — auf 3, 5 oder 10 ccm.

Tabelle I.
Normale Tiere.

Versuchs-nummer	Tier-gewicht	Zeit	Serum	Muskel	Gelenk	Knochen	Verdünnung	
I	1470 g	6 Stdn.	18,5 ccm sehr stark stark	40 g sehr stark mittel	18,5 g sehr stark mittel	8 g mittel Spur	0 10	Verblutung nicht ganz vollständig
II	1460 g	10 Stdn.	20 ccm sehr stark stark	40 g stark mittel-schwach	20,5 g sehr stark mittel	9,5 g mittel schwach	0 5	
III	1300 g	10 Stdn.	12 ccm stark mittel	34 g schwach (gelb) gelb	19 g mittel-schwach schwach	7,5 g schwach Spur	0 5	
IV	1590 g	10 Stdn.	15 ccm sehr stark	40 g schwach (etwas gelblich)	21 g schwach	7,5 g schwach	0	Am proximalen Ende der linken oberen Extremität zahlreiche Eiterballen (Lymphdrüsen)
V	1560 g	10 Stdn.	15 ccm stark	40 g Spur	21 g schwach	8,5 g schwach	0	
VI	1230 g	9 Stdn.	15 ccm stark mittel	40 g mittel-schwach Spur	18 g mittel-schwach Spur	8 g Spur negativ	0 3	Verblutung unvollkommen
VII	—	8 Stdn.	15 ccm stark	35 g schwach Spur	18,5 g mittel	6,5 g schwach	0	
VIII	1300 g	7 Stdn.	15 ccm sehr stark stark	35 g mittel schwach	19,5 g mittel schwach	7,5 g schwach Spur	0 3	
IX	1470 g	8 Stdn.	15 ccm sehr stark stark	35 g mittel schwach	19 g mittel schwach	9 g schwach Spur	0 3	
X	1230 g	9 Stdn.	15 ccm sehr stark stark	35 g sehr stark mittel	16,5 g sehr stark mittel	6,2 g mittel-schwach Spur	0 5	
XI	1470 g	7½ Stdn.	15 ccm sehr stark stark	35 g sehr stark mittel	21,5 g sehr stark mittel	8,5 g mittel Spur	0 5	
XII	1270 g	8 Stdn.	15 ccm sehr stark stark	35 g mittel schwach	18 g mittel-stark mittel-schwach	7 g Spur negativ	0 3	

Tabelle II.

Infizierte Tiere.

Versuchs-nummer	Gewichts-abnahme	Krankheits-dauer	Endgewicht	Zeit	Serum	Muskel	Gelenke	Knochen	Verdünnung	
I	150 g	5 Tage	1225 g	14 Stdn.	18,5 ccm sehr stark stark	40,0 g mittel schwach	19,5 g mittel schwach	7,5 g schwach Spur	0 5	zweimal infiziert
II	150 g	2 Tage	1450 g	16 Stdn.	20 ccm sehr stark	38 g mittel-schwach	18 g mittel	9,5 g mittel-schwach	0	
III	190 g	2 Tage	1270 g	12 Stdn.	20 ccm sehr stark —	40 g mittel-schwach schwach	17,5 g mittel mittel-schwach	9,5 g Spur kaum Spur	0 5	
IV	170 g	2 Tage	1480 g	16 Stdn.	24 ccm Spur	40 g negativ	22 g negativ	8,5 g negativ	0	
V	100 g	4 Tage	1075 g	10 Stdn.	15 ccm stark	28,5 g mittel-schwach	24 g stark	7 g Spur	0	
VI	120 g	4 Tage	1240 g	10 Stdn.	15 ccm sehr stark stark	40 g mittel-schwach schwach	19,5 g stark mittel	7,5 g schwach Spur	0 5	
VII	180 g	3 Tage	1380 g	10 Stdn.	13 ccm sehr stark stark	32,0 g mittel schwach	21,5 g stark mittel	8,5 g schwach schwach	0 3	Verblutung unvollkommen
VIII	90 g	7 Tage	1232 g	10 Stdn.	15 ccm mittel	40 g negativ	18,5 g Spur	8,5 g negativ	0	
IX	150 g	8 Tage	1435 g	10 Stdn.	16 ccm sehr stark stark	34,5 g mittel-schwach schwach	19,5 g stark mittel	10 g mittel schwach	0 4	Verblutung unvollkommen; Knochenmark blutig mit einer patholog. Knochengeschwulst an einem der Röhrenknochen

Die Versuche lehren zunächst, daß im Blute sich verhältnismäßig die meiste Salicylsäure anhäuft. Dabei ist es wahrscheinlich, daß die roten Blutkörperchen höchstens einen kleinen Teil der Säure enthalten, denn in besonderen Versuchen zeigte sich, daß sich die Blutkörperchen sehr leicht mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf Spuren von Salicylsäure freiwaschen ließen. Ob dagegen die Säure zum Teil im lebenden Blut in den

weißen Blutzellen enthalten ist und erst bei der Gerinnung ins Serum übertritt, müßte durch besondere Versuche entschieden werden. Jedenfalls geht so viel Salicylsäure ins Blut, daß es ohne zu große Schwierigkeit gelingen wird, festzustellen, in welcher Form die Substanz hier fixiert ist und welche konstitutiven Eigenschaften der Säure für ihre Fixierung im Blut maßgebend sind. Wir haben derartige Versuche bereits seit längerer Zeit in Angriff genommen, und hoffen vielleicht später darüber berichten zu können.*)

Bei der Weiterverfolgung dieses Befundes wird sich auch herausstellen, ob die Salicylsäure als Antiseptikum im Blut wirken kann, und ob sie oder eine ihr nahestehende Substanz im Sinne Ehrlichs den für das Blut geeigneten Lastwagen darstellt, also einen Stoff, an den man Gruppen kuppeln kann, die durch dieses Vehikel dann im Blute festgehalten werden, um hier spezifische Wirkungen zu entfalten.

Man hat neuerdings in der Therapie mehrfach darauf Wert gelegt, die Salicylsäure direkt ins Blut zu injizieren, da man glaubt, so intensivere Wirkungen gesehen zu haben. Sollte sich diese Ansicht bei weiterer Beobachtung am Krankenbett bestätigen, so wäre es nötig, den Gründen für diese Erscheinung nachzuspüren. Nach unsern Versuchen können wir jedenfalls sagen, daß es vollauf genügt, Salicylsäure oder ihr Natronsalz in den Magen einzuführen, um wenigstens beim Kaninchen rasch eine erhebliche Menge im Blut nachweisen zu können.

Von drei vergleichsweise untersuchten Organen enthielten die Röhrenknochen bzw. die Diaphysen derselben die geringste Quantität Salicylsäure. Genauere Vergleiche in mehreren Fällen bestätigten den sich immer ohne weiteres ergebenden Eindruck, daß sich hier auch relativ die wenigste Salicylsäure vorfindet.**)

Viel mehr Salicylsäure nehmen die Muskeln und die Gelenke auf, und zwar wiederum ohne Zweifel die Gelenke relativ mehr als die Muskulatur. Betrachtet man die Zusammensetzung der untersuchten Kniegelenke, so kann kein Zweifel darüber be-

*) Es sei besonders betont, daß sich die Salicylsäure sicher schon im Blute des lebenden Tieres in großer Menge findet, nicht etwa erst beim Verbluten in das Blut gelangt. Man erhält nämlich entsprechende Resultate, wenn man kleine Mengen dem lebenden Tiere entnimmt.

**) z. B. Tabelle II, Versuch III. Muskel und Gelenk — fünffach verdünnt — entsprechend 8 g Muskel, 3,5 Gelenk — geben stärkere Reaktion wie Knochen 9,5 g unverdünnt.

stehen, daß nur die Knorpelbekleidung und namentlich die Synovia der Gelenke über die die Salicylsäure anziehenden Stoffe verfügen können.*) Es braucht wohl kaum besonders hervorgehoben zu werden, wie diese besondere Selektion der Muskeln und speziell der Gelenke in befriedigender Weise imstande ist, das Verständnis der spezifischen Wirkung der Salizylsäure zu erleichtern.

Bei Durchsicht der Tabelle I erkennt man, daß das Übergewicht der Gelenkselektion in einzelnen Fällen besonders gut zum Ausdruck kommt. Schon zu Beginn des vorigen Wintersemesters, als wir noch mit unvollkommener Methode Versuche ausführten, auf die wir in dieser Arbeit wegen ihrer ungenügenden Beweiskraft nicht bezugnehmen, war uns aufgefallen, daß in einigen Fällen besonders viel Salicylsäure in die Gelenke ging. Als wir dann die Protokolle durchmusterten, fiel uns auf, daß es sich um Tiere gehandelt hatte, denen schon einmal Blut entnommen war, und bei denen beim Versuch vorgefundene Eiterungen vermerkt waren. Wir hielten es daher für möglich, daß sich bei infizierten Tieren eine Änderung der Salicylsäureverteilung geltend macht, welche die Gelenke noch mehr in den Vordergrund rückt.

Wir haben sehr zahlreiche Versuche dieser Art ausgeführt, die alle in gleichem Sinne ausgefallen sind. Wir geben in der Tabelle II nur die Resultate der Versuche wieder, welche ganz in ihrer Anordnung und Methodik den Normalversuchen der Tabelle I entsprechen, sodaß ein direkter Vergleich erlaubt ist.

Zur Infektion benutzten wir stets den Staphylococcus aureus und zwar immer gleichmäßig hergestellte etwa 16 bis 20 stündige Bouillonkulturen. Meistens wurden die Coccen in die Bauchhöhle gespritzt, in einigen Fällen subkutan. Wir begegneten dabei der allbekannten Tatsache, daß die Kaninchen eine ziemlich schwankende Empfänglichkeit für die Staphylococcen besitzen. Zu den Versuchen wurden Tiere mit deutlicher Gewichtsabnahme einige Tage nach der Infektion benützt. Der Grad der Infektion wird etwa dadurch gekennzeichnet, daß die meisten der Tiere wahrscheinlich spontan im Verlaufe weniger Tage zugrunde gegangen wären.

Es hat sich also mit Bestimmtheit bei den infizierten Tieren eine Zunahme der relativen

*) Interessant ist, daß auch mangelhafte Methoden gerade den Salicylsäuregehalt der Gelenke schon deutlich anzeigen, wenn bei anderen Organen noch zu geringe Ausbeuten erhalten werden; auch das deutet auf besondere, aber noch ungeklärte Beziehungen hin.

Salicylsäureverteilung zugunsten der Gelenke herausgestellt; eine Erhöhung der Selektion der Gelenke für diese Substanz. Grobe ohne weiteres sichtbare Veränderungen der Organe sind uns nicht aufgefallen; ob histologische Abnormitäten bestehen, könnten nur besondere Untersuchungen entscheiden. Es ist aber auch a priori durchaus denkbar, daß nur eine Änderung chemischer oder physikalischer Natur vorliegt, welche mit unsern optischen Instrumenten nicht wahrnehmbar ist.

Nur besondere Versuche, nicht Überlegungen werden entscheiden, ob sich vielleicht die Blutserumsubstanz, welche daselbst in der Norm so viel Salicylsäure zurückhält, sich bei der Staphylococceninfektion in den Gelenken anhäuft. Gerade in der allerjüngsten Zeit hat P. Th. Müller*) gezeigt, daß bei verschiedenen Intoxikationen mit abgetöteten Kulturen, darunter namentlich auch mit Staphylococcen, sich Bluteiweißkörper in vermehrter Menge an andern Orten des Körpers finden können. Müller fand nämlich einen vermehrten Gehalt an Fibrinogen im Knochenmark, und hat mit Recht darauf aufmerksam gemacht, daß diese Prozesse mit der Antikörperbildung im Zusammenhang zu stehen scheinen. Hier sei auch eine Beobachtung Ehrlichs**) wiedergegeben, die ihm zum Beweise dient, daß die Lokalisation eines bestimmten Stoffes in einem bestimmten Gewebe überhaupt erst durch gleichzeitige Zuführung einer 2. Verbindung, welche mit der 1. keinerlei Verbindungen einzugehen braucht, ermöglicht wird.

„Infundiert man einem Kaninchen Methylenblau, so beobachtet man stets eine schön ausgesprochene Färbung des Pankreas, welche insbesondere durch eine Färbung der Granula und des Protoplasmas der Langerhansschen Inseln bedingt wird. Eine Darstellung der Nervenendigungen habe ich aber unter diesen Verhältnissen nie beobachtet. Fügt man aber der Infusionslösung gewisse Farbstoffe der Triphenylmethanreihe hinzu, die an und für sich nicht die Nervendigungen darstellen, so sieht man häufig eine geradezu herrliche Färbung des Nervenapparates auftreten. Ich glaube, daß man in diesen und andern Fällen solcher Begünstigung nur daran denken kann, daß durch die begünstigenden Stoffe die Funktion der betreffenden Apparate eine Modifikation erfährt, welche eine Änderung des oben definierten, chemischen Milieus und dadurch eine Änderung der Speicherungskraft nach sich zieht. Es ist möglich, daß ähnliche Momente auch bei manchen Formen abnormer Arzneiwirkungen, insbesondere der ererbten oder erworbenen Überempfindlichkeit eine gewisse Rolle spielen."

*) Diese Beiträge 6 (1905).

**) Festschrift für Leyden 1902. — Abgedruckt in den Gesammelten Arbeiten 1904.

Unsere Versuche tragen jedenfalls dazu bei, die elektive Salicylwirkung gegenüber bestimmten Infektionen aufzuhellen; denn es erscheint wohl denkbar, daß gerade die Erreger des akuten Gelenkrheumatismus in besonders hohem Grade die Fähigkeit haben, die Salicylsäure in die Gelenke abzulenken. So würde auch die aus der Klinik stammende Erfahrung ihre Erklärung finden, daß die therapeutisch notwendigen großen Dosen von Salicylsäure, und ähnlich liegt es vielleicht auch beim Antipyrin, von den Gelenkkranken viel besser als von den Gesunden vertragen werden, bei denen eben mehr des Mittels in empfindliche Körperregionen wandert.

Pawlows Mahnung, pharmakologische Versuche an kranken Tieren zu machen, hat also im vorliegenden Falle sichtlich die Erkenntnis gefördert und man darf hoffen, daß auch andere Fragen, wie die Wirkung des Diphtherieheilserums auf den Prozeß im Rachen, die Genese der Gicht usw., von den neuen Gesichtspunkten aus in ihrer experimentellen Beurteilung gewinnen werden. —

Im folgenden sei das Ergebnis der Arbeit nochmals zusammengefaßt:

1. Den höchsten, relativen Gehalt an Salicylsäure besitzt in allen untersuchten Fällen das Blut; relativ hoch ist auch der Gehalt der Gelenke an Salicylsäure, besonders deutlich bei infizierten Tieren.

2. Die Salicylsäure ist, wenn man von ihrer relativen Verteilung absieht, an und für sich durchaus polytrop; wir haben sie in vielen Organen, wenn auch zum Teil nur in Spuren, die durch die Blutreste ihre Erklärung finden könnten, nachgewiesen.*)

Anhangsweise wollen wir gleichsam als vorläufige Mitteilung einige Nebenbefunde mitteilen, die aus verschiedenen Gründen eine eingehendere Bearbeitung lohnen würden.

3. Außer bei der Zufuhr der Salicylsäure und ihres Natronsalzes finden sich auch bei der Einverleibung von Aspirin und Paraamidosalicylsäure in Blut und Gelenken deutliche Mengen von Salicylsäure oder Salicylsäurederivaten.

4. Die infizierten Tiere scheinen die Salicylsäure langsamer auszuscheiden als die normalen.

5. Vom Serum befreite, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Blutkörperchen vom Kaninchen besitzen eine, wenn

*) Während der Ausscheidung der Salicylsäure sinkt der Gehalt der Organe an diesem Stoffe entsprechend den ursprünglich darin aufgespeicherten Mengen. Sie schwindet zuerst aus den Knochen, zuletzt aus dem Serum.

auch nicht sehr bedeutende Empfindlichkeit gegen Natrium salicylicum. Die Empfindlichkeit ist bei einzelnen Tieren eine ausgesprochen verschiedene; diese Verschiedenheit läßt sich bei mehrfacher Untersuchung des Blutes derselben Tiere immer wieder feststellen.

Mehrfach wurde beobachtet, daß die Zerstörung der Blutkörperchen bei einer ganz bestimmten Konzentration des Giftes stattfand, bei einer etwas höheren ausblieb, um dann bei weiterer Steigerung der Giftdosis wieder beobachtet zu werden.

6. Giftlösungen, die mit empfindlichen oder unempfindlichen Blutkörperchen in Berührung waren, verlieren ihre Giftwirkung für Blutkörperchen.

XXXIII.

Die Ausscheidung der Aminosäuren bei Gicht und Leukämie.

Von Dr. A. Lipstein.

Aus dem städtischen Krankenhause zu Frankfurt a. M.
Innere Abteilung. Oberarzt: Professor Dr. v. Noorden.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit haben Embden und Reese*) den Nachweis geführt, daß sich im Harn gesunder Individuen erhebliche Mengen Aminosäuren vorfinden. Mittels der von diesen Autoren angewandten Modifikation der Fischer-Bergellschen Naphthalinsulfochloridmethode konnten Plaut und Reese**) zeigen, daß auch nach Verabreichung sehr geringer Mengen von r-Alanin stets Alanin in den Harn übergeht, während von früheren Autoren namentlich von Rahel Hirsch***) das Übertreten von Alanin in den Harn nur unter bestimmten Ernährungsbedingungen beobachtet werden konnte. Embden und Reese haben auch in einer Reihe von Fällen versucht, die Menge der aus normalem Harn erhältlichen Aminosäureverbindungen festzustellen, und wenn auch die in diesen Fällen gefundene Ausbeute einstweilen keineswegs als quantitative angesehen werden darf, so schien es doch immerhin möglich, gröbere Abweichungen des Aminosäurengehaltes im Harn unter pathologischen Verhältnissen festzustellen.

Zunächst untersuchte ich einen Teil jener Krankheitszustände, bei denen bereits früher an der Hand der β-Naphthalinsulfochloridmethode durch Ignatowski eine Vermehrung der Aminosäurenausfuhr beschrieben wurde, d. h. besonders Gicht und Leukämie. Von vornherein konnte das Vorkommen von Aminosäuren, speziell von Glykokoll im Harn nicht als qualitativ der

---

*) Embden und Reese, Diese Beiträge 7, 411.
**) Plaut und Reese, Diese Beiträge 7, 425.
***) Zeitschr. f. exper. Pathologie 1, 144 (1905).

Gicht oder anderen Krankheiten eigentümlich betrachtet werden, da ja Embden und Reese dieses als konstanten Befund im normalen Harn ermittelt hatten, immerhin erwartete ich auf Grund der von Ignatowski*) erhobenen Befunde bei den erwähnten Krankheiten eine bedeutende Steigerung jener Verbindungen gegenüber der Norm. Über die Einzelheiten der von mir benutzten Methodik siehe Embden und Reese, diese Beiträge a. a. O. S. 415 u. 418).

Der Harn wurde in der dort beschriebenen Weise so oft mit β-Naphthalinsulfochlorid behandelt, bis keine oder nur Spuren von Reaktionsprodukten beim Ansäuern auftraten, wozu in den meisten Fällen zwei bis drei, gelegentlich wohl auch viermaliges jeweils mehrtägiges Schütteln nötig war. Bei weitem die Hauptmasse der Produkte wurde aber bei der ersten Schüttelung gewonnen.

Die Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	1	2	3	4	5	6	7
Nr.	Name und Datum	Krankheit	Gesamtharnmenge	Verarbeitete Harnmenge	Gewogene Menge Aminosäuren	Auf die Tagesmenge berechnete Aminosäurenverbindung	Bemerkungen
1	Vic.	Gicht	1120 ccm	500	0.474 g	1.06 g	Beim Wägen ging etwa Substanz verloren
2	Op.	„	1565 ccm	500	0.506 g	1,58 g	
3	Rüp	„	1650 ccm	500	0 389 g	1,28 g	Purinfreie Diät
4	Jour.	„	1580 ccm	500	0,3[illegible] g	1,[illegible]3 g	Gemischte Kost
5	Deu.	Myelogene Leukämie	1180 ccm	500	0,562 g	1,32 g	Gemischte Kost Keine Bestrahlung
6	„	„	1090 ccm	500	0,427 g	0,93 g	Purinfreie Kost Keine Bestrahlung
7	„	„	1300 ccm	500	1,126 g	2,93 g	Purinfreie Kost Bestrahlt
8	Ko.	„	540 ccm	350	0,71 g	1,09 g	Nicht bestrahlt
9	Su.	„	925 ccm	275	0,576 g	1,94 g	Nicht bestrahlt Gemischte Kost
10	„	„	900 ccm	200	0,41[illegible] g	1,85 g	Nicht bestrahlt Gemischte Kost
11	„	„	900 ccm	245	0,449 g	1 65 g	Nicht bestrahlt Gemischte Kost

Es wurde der Harn von vier verschiedenen Gichtfällen, darunter einer im Anfallstadium untersucht. Außerdem stand mir der Harn von drei Fällen myelogener Leukämie zur Verfügung.

*) Ignatowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 371 (1904).

Aus der Kolonne 6 sind die auf 24 Stunden berechneten Mengen von Aminosäureverbindungen ersichtlich. Selbstverständlich war das β-Naphthalinsulfamid vorher beseitigt worden.

Die gewonnenen Werte sind in keinem Fall wesentlich höher, als sie von Embden und Reese auch im normalen Harn gefunden wurden, sie schwanken annähernd in denselben Grenzen wie dort. Die verschiedenen bei der Gicht gewonnenen Werte sind eher etwas niedriger (1,06 g bis 1,58 g) als die Mehrzahl der gefundenen Normalwerte. Die bei der Leukämie ermittelten Werte sind z. T. etwas geringer (siehe Versuch 6, erhaltene Ausbeute 0,93 g), z. T. den Gichtwerten ähnlich (siehe Versuch 5, 8 und 11), z. T. etwas höher als die letzteren (siehe Versuch 9 und 10, vor allem Versuch 7). Derselbe Leukämiker, der in einem früheren Stadium der Erkrankung sehr niedrige Werte der Aminosäurenverbindungen gezeigt hatte (1,32 g und 0,93 g), wies in einem späteren Stadium der Untersuchung den höchsten beobachteten Wert der ganzen Versuchsreihe, nämlich fast 3 g auf. Es sei erwähnt, daß der Patient in dieser Zeit einer energischen Behandlung mit Röntgenstrahlen unterworfen wurde, während die beiden ersten Zahlen einer Periode angehören, in der diese Therapie noch nicht eingeleitet war. Auch bei den anderen beiden Leukämiekranken wurde der Harn einer Periode untersucht, in der noch keine Röntgenbehandlung zur Anwendung gelangt war, hingegen erhielten diese Patienten im Gegensatz zu dem erst genannten Natrium arsenicosum innerlich. In den letzten drei Versuchen, wo der Harn desselben Kranken während dreier auf einander folgender Tage untersucht wurde, sind die Werte auffällig ähnlich.

Irgend ein Einfluß der Ernährung ist nicht bemerkbar, trotzdem diese zu verschiedener Zeit ganz verschieden war, da bei einem Teil der Gichtkranken wie auch gelegentlich bei den Leukämiefällen purinfreie Kost verabreicht wurde, während die Mehrzahl der Untersuchungen von Kranken mit gemischter, frei gewählter Kost herrührt. Jedoch dürfte der Einfluß der Ernährung auf die Aminosäurenausscheidung besser an gesunden Individuen studiert werden. Darauf, wie auch auf die Art der ausgeschiedenen Aminosäuren wird später einzugehen sein, einstweilen ließen sich Anhaltspunkte dafür nicht gewinnen, daß die Aminosäuren in den genannten Krankheitszuständen anderer Art seien wie bei gesunden Menschen.

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist dahin zusammenzufassen, daß bei Gicht und myelogener Leu-

kämie Aminosäurenmengen ausgeschieden werden, die zwar die von Ignatowski gefundenen Zahlen um ein Vielfaches übertreffen*), trotzdem aber annähernd innerhalb derselben Grenzen, wie die normalen Aminosäurewerte schwanken.

---

*) Nur bei einem Fall von Leukämie nähern sich die von Ignatowski ermittelten Zahlen (a. a. O., Zeitschr. f. physiol. Chemie S. 399) den geringsten von mir gefundenen.

Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

VII. Band. 12. Heft

(Ausgegeben Januar 1906)

Braunschweig

Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1906.

Inhalt des 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40.— für den Druckbogen und 50 Sonderabzüge.

XXXIV.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

Fünfte Mitteilung.

Die elektrische Ladung von Eiweiß.

Von **Wolfgang Pauli.**

Ausgeführt mit Unterstützung der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.

Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt Rudolfstiftung (Vorstand: Dr. E. Freund) und dem k. k. serotherapeutischen Institute in Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf).

I.

Die Forschungen der letzten Jahre haben die Bedeutung der elektrischen Ladung der Teilchen eines Kolloides für seine Stabilität immer mehr enthüllt. Die Grundtatsachen, aus denen dieser Zusammenhang von Ladung und Fällbarkeit erhellt, sind folgende: Gelöste Kolloide zeigen durch ihre Wanderung zu einem der Pole eines elektrischen Stromes den Sinn ihrer Ladung an. Nur entgegengesetzt geladene Kolloide fällen sich gegenseitig aus. Ausgefällte Kolloide sind in der Regel mehr oder minder unelektrisch, werden vom Strome nicht mitgenommen. Eine neuerliche Ladung treibt die abgeschiedenen Teilchen sehr häufig wieder in Lösung.

Die Wanderung im elektrischen Felde wurde an anorganischen Kolloiden von Linder und Picton[1]), Coehn[2]), Zsigmondy[3]), Bredig[4]), an organischen von Hardy[5]), Much, Römer und Siebert[6]) und Billitzer[7]) studiert. Behufs besseren Eindringens in das Wesen der Proteinfällungen war ein neuerliches Studium des elektrischen Verhaltens von Eiweiß mehrfach geboten. Zunächst ist das vorliegende Material sehr dürftig und gegenüber der Mannigfaltigkeit von Fragen, welche die bisherigen Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen von Eiweißkörpern brachten, völlig unzulänglich. Eingehendere Versuche

wie die wichtige Arbeit Hardys[5]) sind überhaupt nicht an gelöstem, sondern an durch Hitze koaguliertem Eiweiß ausgeführt. In anderen vorliegenden Versuchen erscheint die störende Nebenwirkung der Elektrolyse nicht ausreichend beseitigt. Die Rolle der Elektrolyse, deren Produkte an den Elektroden die Proteine umladen und gegen die Mitte drängen, ist sowohl von Hardy als auch von Billitzer, der gelegentlich neben anorganischen Kolloiden die Gelatine untersuchte, richtig erkannt und gewürdigt worden. Methodisch einwandfrei für eine quantitative Orientierung sind nur die Versuche Billitzers angeordnet. Dieser verwendet zwei Elektrodengefäße und ein Zwischengefäß, das mit den ersteren durch eingetauchte Heber kommuniziert. Nach der elektrischen Durchströmung werden die Heber entfernt und der Inhalt jedes der Gefäße analysiert. Bei fehlender Repulsion des Kolloides von den Elektroden ist dessen Konzentration im Mittelgefäße unverändert geblieben.

II.

Bei unseren Versuchen*) wurde Rinder- und Pferdeserum benützt und die größte Sorgfalt auf dessen Befreiung von Elektrolyten**) verwandt. Auf diese Weise konnte das elektrische Verhalten von reinem Eiweiß und der Einfluß verschiedener Zusätze auf dasselbe erkannt werden. Neben der experimentellen Sicherstellung theoretisch ableitbarer Fälle haben sich dabei auch neue Tatsachen und Gesichtspunkte gewinnen lassen.

Versuchsmethodik. Frisch bezogenes, abzentrifugiertes Serum wurde toluolisiert und einer mindestens 6 bis 8 wöchentlichen Dialyse in zahlreichen, dichten, nahtfreien Pergamentpapiersäcken unterworfen. Die Diffusion fand anfangs gegen strömendes Wiener Hochquellwasser, in den letzten Wochen in großen Gefäßen gegen 12 stündig erneuertes destilliertes Wasser statt, das mit (obenauf schwimmendem) Toluol und (einer Bodenschichte) Chloroform versetzt war. Der Elektrolytgehalt des Dialysates wurde nach Bedarf durch elektrische Widerstandsbestimmung kontrolliert. Unter den gewählten Bedingungen blieb das Material fäulnisfrei. Am Schlusse wurde vom ausgefällten Euglobulin abfiltriert.

Die gewonnene salzarme Eiweißlösung wurde im Versuche mit Wasser oder den zu prüfenden Zusätzen noch vierfach verdünnt und zu je 50 ccm in formgleiche (0,1 Liter-)Gläser gebracht. Diese waren durch hineingestellte u-förmige, in der Mitte mit Ansatzstück zum Ansaugen und einem Gummiverschluß versehene Glasröhren verbunden. Anfangs kamen zur sicheren Trennung der Elektrodenflüssigkeiten fünf, später, als sich dies durch Bestimmungen überflüssig erwies, drei Gefäße in Verwendung, ein

*) Dieselben sind schon im Herbst 1904 vor Erscheinen der Abhandlung Billitzers, welche die einschlägigen Verhältnisse vielfach geklärt hat, in zweckmäßiger Weise begonnen worden.

**) Nach Abschluß dieser Mitteilung wurde die Methode noch weiter vervollkommnet.

Mittel- und zwei Elektrodengefäße, in welche die Platinelektroden eingesenkt wurden. Solche waren in zweifacher Größe vorhanden 20 mm hoch, 4,5 mm breit und 40 mm hoch, 12 mm breit.

Bei Parallelschaltung zweier solcher Vorrichtungen konnten auch Doppelversuche gemacht werden. Als Strom diente Gleichstrom von 250 Volt und 6 Ampère, zur Messung ein Westonsches Präzisionsmilleampèremeter von abstufbarer Empfindlichkeit. Die Zeit der Durchströmung wurde von 3 bis 48 Stunden variiert. Am Ende des Versuches wurde die Kommunikation der Bechergläser durch achtsames Herausheben der 4 ccm Flüssigkeit enthaltenden Verbindungsröhren unterbrochen und der Inhalt der Gefäße durch N-Bestimmung nach Kjeldahl analysiert. Es wurden immer Doppelbestimmungen oder Parallelversuche vorgenommen. Ein wesentlicher Umstand ist die sorgfältige Mischung des Gefäßinhaltes vor der Entnahme der Analysenproben. Infolge der elektrischen Konvektion tritt nämlich eine schichtenweise sich ändernde Verteilung des Eiweißes in jedem einzelnen Gefäße auf, die bei der mangelnden Unterstützung durch Diffusion nur durch sehr langes und sorgsames Schütteln aufgehoben werden kann. Der Fehler durch Verdunsten verteilt sich gleichmäßig auf alle Gefäße. Er wurde übrigens durch Kontrollversuche bestimmt und erreichte für die meist 6 stündigen Versuche, die bei der verwendeten Stromspannung auslangten, keinen störenden Betrag. In den Versuchstabellen bedeuten die Zahlen die Menge der zur Neutralisation des überdestillierten Ammoniak verbrauchten $^{1}/_{4}$-Normalsalzsäure in Kubikzentimetern. A, M und K entspricht Anode, Mitte und Kathode.

A. Versuche mit elektrolytarmem Eiweiß.

I. Pferdeserum dialysiert 20. XI. 04 bis 3. I. 05, Strom von 250 Volt und 6 Ampère gibt 0,00002 Ampère, Stromdauer 3 Stunden. Am Schlusse kein Reaktionsunterschied zwischen A- und K-Gefäßinhalt. 10 ccm Flüssigkeit zur N-Bestimmung.

A	M	K
3,7	3,8	3,85
3,85	3,75	3,75

II. Dasselbe unter gleichen Umständen, Stromdauer 6 Stunden von 0,00002 Ampère.

A	M	K	Kontrolle vor dem Versuch
4,0	3,85	3,95	3,95
4,0	3,95	4,0	3,95

III. Alles gleich den Versuchen I und II, nur Stromdauer 24 Stunden. Keine Reaktionsänderung am Schlusse, nur an der Kathode Entfärbung der zart gelblichen Flüssigkeit, keinerlei Trübung.

A	M	K
4,15	4,05	3,8
4,15	4,1	3,8

IV. Wiederholung von Versuch III, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,3	8,0	7,6
8,25	8,0	7,75

V. Alles wie früher, nur Stromdauer 48 Stunden und 15 ccm zur N-Bestimmung, keine Reaktionsänderung.

A	M	K
6,05	7,2	5,85
6,05	7,2	5,85

VI. Rinderserum, 7 Wochen dialysiert, Stromdauer 6 Stunden, 0,00003 Ampère, Reaktion unverändert geblieben, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,8	8,05	7,8
7,75	7,95	7,9

VII. Wie Versuch VI, nur Stromdauer 24 Stunden, keine Reaktionsänderung, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
9,05	9,1	8,5
8,7	9,2	8,45

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß ein elektrolytarmes Eiweiß auf elektrische Konvektion geprüft bei 6stündigem Durchströmen eine merkliche Wanderung nach einer Richtung nicht erkennen läßt. Erst bei 24stündiger Elektrisierung zeigte ein Pferdeserum durch Bewegung gegen die Anode Andeutung einer elektronegativen Ladung (III, IV). Diese Erscheinung kann bei 48stündiger Durchströmung nicht merklicher gemacht werden. Es tritt vielmehr ohne nachweisbare Reaktionsänderung in den Elektrodengefäßen Zurückdrängung des Proteins gegen die Mitte ein, wo der Eiweißgehalt zunimmt. *Ein lange dialysiertes Rinderserum und ein zweites Pferdeserum zeigte überhaupt keine sicher nachweisbare elektrische Ladung* sondern schon nach 6stündiger ebenso wie nach 24stündiger Durchströmung höchstens Andeutung von Repulsion gegen die Mitte.

B. Versuche mit Säuren und Basen.

VIII. Pferdeserum wie oben, mit Essigsäure versetzt zum Gehalte von 0,005 normal. Resultierende klare gelbliche Flüssigkeit gegen Lackmus

sauer. Passierender Strom 0,0001 Ampère durch 6 Stunden. Auch am Schlusse Flüssigkeit überall sauer und klar, an der Kathode etwas entfärbt. Je 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,2	7,65	8,05
7,2	7,55	8,05

IX. Versuch wie VIII, Essigsäuregehalt 0,01 normal, Stromstärke 0,00015 Ampère durch 6 Stunden, Flüssigkeit am Schlusse klar, Reaktion und Farbe unverändert, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,05	7,55	8,2
7,0	7,45	8,25

X. Dasselbe Serum, Essigsäuregehalt 0,03 normal, Stromstärke 0,00025 Ampère durch 6 Stunden, Flüssigkeit zeigt keine Veränderung, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,0	7,55	8,35
7,0	7,55	8,0 ?

XI. wie Versuch X, Essigsäuregehalt 0,04 normal, Strom 0,0003 Ampère durch 6 Stunden, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,0	7,5	8,2
7,0	7,55	8,55

XII. Dialysiertes Rinderserum von Versuch VI, Salzsäurezusatz auf 0,01 normal, Strom von 0,0013 Ampère durch 6 Stunden, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,4	8,05	9,1
7,45	8,05	9,05

In Säuren gewinnt Eiweiß elektropositiven Charakter und wird zur Kathode geführt. Mit zunehmendem Säuregehalt wächst für dasselbe Eiweiß die übergeführte Menge anfangs, um dann bei weiterer Säuerung konstant zu werden. In der stärker dissoziierten Salzsäure ist die mit dem Strom transportierte Menge größer als in der schwächer ionisierten Essigsäure.

XIII. Pferdeserum, Natrongehalt 0,005 normal, Strom von 0,00033 Ampère durch 6 Stunden, 20 ccm zur N-Bestimmung. Alkalische Reaktion unverändert.

A	M	K
8,15	7,75	7,05
—	7,75	7,05

XIV. wie XIII, Natronlauge 0,01 normal, Strom 0,0009 Ampère durch 6 Stunden, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,3	7,65	6,8
8,3	7,6	6,8

XV. wie XIV, Natronlauge 0,02 normal, 6 Stunden Strom von 0,00255 Ampère, H- und O-Entwicklung. Am Schlusse sämtliche Portionen alkalisch geblieben, M und K lichter gefärbt als A, keine Trübung, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,25	7,65	6,8
8,25	7,6	6,85

XVI. Rinderserum wie in Versuch XII, Natronlauge 0,01 normal, Strom von 0,00095 Ampère durch 6 Stunden, Reaktion bleibt überall alkalisch, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,8	7,6	7,2
8,8	8,0	7,35

In Laugen gewinnt Eiweiß elektronegativen Charakter. Mit wachsendem Laugengehalt erreicht bei den gewählten Versuchsbedingungen die überführte Eiweißmenge rasch ein Maximum, das sich nicht weiter ändert.

C. Versuche mit Salzen.

XVII. Pferdeserum wie oben, Kochsalzgehalt 0,001 normal, Stromstärke 0,00015 Ampère durch 6 Stunden. Am Schlusse Reaktion in K und M neutral, A sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,55	7,5	7,55
7,5	7,6	7,55

XVIII. wie Versuch XVII, Kochsalzgehalt 0,005 normal, Strom von 0,0006 Ampère durch 6 Stunden. Am Schlusse K und M neutral, A sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,5	7,8	7,45
—	7,8	—

XIX. wie XVIII, Kochsalzgehalt 0,01 normal, Strom von 0,00105 Ampère durch 6 Stunden. Am Schlusse A sauer, M neutral, K alkalisch, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,6	7,9	7,55
7,5	7,9	7,55

XX. Rinderserum wie in XVI, Kochsalz 0,01 normal, Strom von 0,0011 Ampère durch 6 Stunden, K schwach alkalisch, M neutral, A sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,9	8,15	7,8
7,8	—	7,7

Kochsalz vermag dem Eiweiß keinerlei elektrische Ladung zu erteilen, nur sekundäre Verdrängung gegen die Mitte wird merklich.

XXI. Pferdeserum wie oben, $CaCl_2$ 0,005 normal, Strom von 0,000525 Ampère durch 6 Stunden, Reaktion bei A sauer, K schwach alkalisch, M neutral, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,6	7,6	7,5
7,6	7,6	7,5

XXII. wie XXI, $CaCl_2$ 0,01 normal, Strom von 0,00125 Ampère 6 Stunden. Am Schlusse K alkalisch, M neutral, A schwach sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,4	7,5	7,4
7,4	7,6	7,5

XXIII. wie XXI, $CaCl_2$ 0,01 normal, Strom von 0,001 Ampère 6 Stunden, sonst alles gleich.

A	M	K
7,45	7,55	7,4
7,45	7,55	7,4

XXIV. Rinderserum wie XX, $CaCl_2$ 0,01 normal, 0,00105 Ampère 6 Stunden, K alkalisch, M neutral, A sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,05	8,0	7,75
7,8	8,0	7,75

XXV. Pferdeserum wie oben, $BaCl_2$ 0,005 normal, Strom von 0,0006 Ampère durch 6 Stunden, A schwach sauer, K und M neutral, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,65	7,75	7,45
7,45	7,75	7,3

XXVI. Pferdeserum, $BaCl_2$ 0,01 normal, Strom 0,00175 Ampère durch 6 Stunden, K schwach alkalisch, M neutral, A schwach sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,55	7,7	7,45
7,6	7,6	7,45

Auch die Salze der Erdalkalien vermögen nicht dem Eiweiß eine durch Konvektion merkbare elektrische Ladung zu erteilen. Die Verdrängung von Eiweiß gegen die Mitte ist auch hier vorhanden, aber trotz sehr deutlicher Reaktionsänderung an den Elektroden auffallend gering.

XXVII. Rinderserum, Na_2CO_3 0,01 normal, Strom 0,00083 Ampère 6 Stunden, Reaktion bleibt alkalisch, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,4	7,9	7,5
8,45	7,95	7,3

XXVIII. Rinderserum, $NaHCO_3$ 0,01 normal, Reaktion des Salzes allein gegen Phenolphthalein blaßrosa, bei Eiweißzusatz entfärbt. Die Eiweißsalzmischung gegen Lackmus neutral. Strom 0,0007 Ampère 6 Stunden, Reaktion am Ende des Versuches gegen Lackmus bei K und M alkalisch, bei A schwach sauer, große Platinelektroden, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
10,15	8,25	6,25
10,0	8,25	6,2

XXIX. Rinderserum, Na_3PO_4 0,01 normal, Reaktion überall alkalisch auch am Schlusse des Versuches, Strom 0,00095 Ampère 6 Stunden, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,65	8,1	7,55
8,75	8,2	7,6

XXX. Rinderserum, Na_2HPO_4 0,01 normal, Strom 0,00065 Ampère 6 Stunden, Reaktion anfangs neutral gegen Lackmus, am Ende K schwach alkalisch, M neutral, A schwach sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
8,2	7,7	7,35
8,15	7,75	7,4

XXXI. Rinderserum, NaH_2PO_4 0,01 normal, 0,00033 Ampère 6 Stunden, Reaktion schwach sauer, 20 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
7,95	7,85	8,05
7,8	7,85	8,05

Die untersuchten nicht neutralen Salze bewirken, parallel ihrem Verhalten gegen Lackmus, kathodische oder anodische Konvektion von Eiweiß. Sehr schön tritt am $NaHCO_3$ hervor, daß, ähnlich wie bei Säuren oder Basen durch zunehmenden Gehalt an freien H- oder OH-ionen über eine gewisse Grenze der elektrische Transport von Protein nicht gesteigert wird, auch hier die nach Eiweißzusatz noch freien OH-ionen ohne Belang erscheinen. In einer gegen Lackmus neutralen, gegen Phenolphthalein merklich sauren Mischung von Eiweiß mit Bikarbonat ist das Eiweiß stark negativ und zwar so weit, daß trotz des schließlichen Umschlagens der Reaktion an der Anode ins Sauere und leichter Proteinverdrängung gegen die Mitte der Sinn des Resultates unbeeinflußt bleibt. Analoge Verhältnisse finden sich beim Dinatriumphosphat. Diese Erfahrungen sind sehr lehrreich für die Beurteilung der elektrischen Ladung von Eiweiß in den tierischen Säften (s. u.), welche nicht ohne weiteres aus dem Verhalten derselben gegen Farbstoffindikatoren oder in Konzentrationsketten abgeleitet werden darf.

III.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergeben sich einige bemerkenswerte Konsequenzen für das chemische und biologische Verhalten von Eiweiß, zugleich aber gestatten dieselben eine Stellungnahme zu einigen teilweise strittigen theoretischen Annahmen über die Kolloide.

Hält man sich zunächst an die Beobachtung, daß elektrolytarmes Eiweiß entweder gar keine oder nur Spuren (Reste infolge ungenügender Dialyse) einer elektronegativen Ladung aufweist, so müßte es in diesem Zustande nach den von Hardy-Bredig[8]) entwickelten Vorstellungen eine sehr geringe Stabilität gegen Fällungsmittel besitzen. Denn nach diesen Autoren würden die Kolloide durch Oberflächenkräfte zusammengeflockt, die bei Wegfall der entgegenwirkenden elektrischen Potentialdifferenz zwischen Kolloidteilchen und ihrem Medium das Maximum ihrer Wirkung entfalten sollen.

Entgegen dieser Theorie hat Billitzer in hohem Maße wahrscheinlich gemacht, daß bei zu geringer elektrischer Ladung und genügender Kleinheit der Teilchen die Kolloide eine große Stabilität gegen Ausflockung zeigen werden. Nach Billitzers Auffassung kommt die Fällung nämlich dadurch zustande, daß durch die zugesetzten elektrisch gegensinnigen Ionen (oder Kolloide) die Kolloidpartikeln unter Ausgleich der Ladungen gesammelt werden, wobei die gebildeten Aggregate die kritische Größe überschreiten, sichtbar werden und sich schließlich absetzen. In bezug auf die Eiweißfällung durch Salze stimmen die Erfahrungen bei den Schwermetallfällungen[9]) mit der Theorie Billitzers sehr befriedigend überein, soweit es sich um die Einwirkung verdünnter Lösungen handelt, die wir[9]) ebenso wie Biltz[10]), Landsteiner[11]), Neißer und Friedemann[12]) auf das hydrolytisch abgespaltene, wohl kolloidal gelöste Metallhydroxyd beziehen. Für die Fällung durch Neutralsalze der Alkalien, Erdalkalien und gewisse hochkonzentrierte Schwermetalle kann die elektrische Theorie in ihrer gegenwärtigen Form noch keineswegs als erschöpfend betrachtet werden.

Wenn wir daran festhalten*), daß entgegen Hardy-Bredig Kolloide ohne elektrische Ladung durch große Stabilität gegen-

*) In bezug auf die geistvoll begründete Hypothese Billitzers, daß die Kolloide eine kleinere Ladung als Salzionen besitzen, nehme ich eine zuwartende Stellung ein. Ebenso muß es wohl noch offen bleiben, ob für die auffallend große Empfindlichkeit der Kolloide gegen einander — hierher gehört auch offenbar die kürzlich von Bokorny[15]) berichtete Speicherung von hochverdünnten Metallgiften in Zellen — die Teilchengröße der reagierenden Komponenten den einzigen Erklärungsgrund bildet.

über anderen Kolloiden ausgezeichnet sind, so würde sich für unser dialysiertes Eiweiß ergeben, daß es mit verdünnten Lösungen von Schwermetallsalzen bzw. kolloidalen Metallhydroxyden gar nicht oder nur in geringem Maße reagieren sollte. Der Versuch bestätigte diese Voraussetzung.

Es ist unter Anwendung aller gebotenen Kautelen nicht möglich, unser Eiweiß durch Zn-, Cu-, Hg-, Fe-, Pb-salze zu fällen, Silbernitrat und Uranacetat gaben Trübungen. Natives Eiweiß zeigt unter den gleichen Verhältnissen mit allen diesen Mitteln mächtige Niederschläge.

Nebenher sei hier bemerkt, daß diese Stabilität des salzarmen Proteins mit seinem Verhalten bei der theoretisch noch nicht völlig aufgeklärten Koagulation durch Hitze (oder Abscheidung durch Alkohol) nichts zu tun hat. Ein genügend von Elektrolyten freies, ungefaultes Eiweiß koaguliert leicht beim Erhitzen [Starke[13]), W. Erb[14])] zum Unterschiede von einem durch Verdünnen oder mäßige Dialyse nur salzärmer gemachten [Starke[13])]. Auch unser gegen elektropositive Kolloide stabiles Eiweiß ergab ohne weiteres Koagulation durch Hitze, Fällung durch Alkohol und ebenso durch hochkonzentrierte Neutralsalze der Alkalien oder Schwermetalle (Zinksulfat).

Die Ausflockung durch elektronegative Kolloide oder Ionen, wie die Anionen der Ferrocyanwasserstoff-, Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdansäure oder viele saure Anilinfarbstoffe [M. Heidenhain[16])], ist nur ausführbar, wenn dem Eiweiß vorher durch Säurezusatz eine positive Ladung erteilt wird. Unter diesen Umständen kann, wie auch der Versuch lehrt, zwischen dem nativen und dialysierten Eiweiß kein qualitativer Unterschied bestehen.

Auf Grund der vorliegenden Erfahrungen ist es nun auch möglich, über den elektrischen Zustand von nativem Eiweiß Bestimmtes auszusagen, wiewohl damit ein reiner direkter Überführungsversuch wegen der starken Elektrolyse, Gas- und Wärmebildung*) nicht einwandsfrei auszuführen ist. Allein die Tatsache, daß natives Eiweiß ohne weitere Zusätze durch elektropositive Kolloide fällbar ist, beweist zusammengehalten mit der von uns festgestellten Unfällbarkeit des dialysierten ungeladenen Albumins durch dieselben, daß die Eiweißstoffe in den tierischen Säften in elektronegativem Zustande verkehren. Dem Umstande, daß sowohl mit empfindlichen Farbstoffindikatoren [Friedenthal[17])]

*) In unserem Strom verbrannte natürliches Serum bei Eintauchen der Elektrode.

als auch mit Konzentrationsketten [P. Fraenkel[18])] eine neutrale Reaktion des Blutes und der Gewebsflüssigkeiten erwiesen ist, kann in der Frage nach der elektrischen Ladung ihres Eiweißes keine ausschlaggebende Bedeutung zuerkannt werden. Zeigte sich doch bei unseren Versuchen dialysiertes Eiweiß in gegen Lackmus neutralen, gegen Phenolphthalein schwach sauren Mischungen mit alkalischen Salzen als Träger einer starken elektronegativen Ladung. Demgemäß bot eine solche Eiweißbikarbonatmischung (dieselbe wie in Versuch XXVIII) mit anodischer Konvektion auch prompte Fällbarkeit durch elektropositive Kolloide. Hebt man andererseits durch schwache Säuerung die negative Ladung von nativem Eiweiß auf, so wird es, ebenso wie das ungeladene dialysierte, unfällbar durch die positiven Schwermetallhydroxyde.

Die Überführungsversuche von Eiweiß mit schwach sauren oder alkalischen Salzen sprechen auch mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß die elektronegative Ladung des natürlichen Eiweißes in dem Verhältnisse der gleichzeitig anwesenden Salze begründet sein wird. Da sich jedoch unser dialysiertes Eiweiß von dem natürlichen auch noch durch den Wegfall der wasserunlöslichen Euglobulinfraktion unterschied, so war die Untersuchung jedenfalls geboten, ob dem Euglobulin an sich ein Einfluß auf die Ladung von anderem Eiweiß zukäme.

Durch extreme Dialyse von Rinderserum gewonnenes Euglobulin wurde auf dem Filter gewaschen, bis das Waschwasser keine Eiweißreaktion gab. Hierauf wurde es in Kochsalz gelöst und die trübe stark opaleszierende Flüssigkeit verdünnt und filtriert. Ihr Kochsalzgehalt wurde durch Titration als 0,0165 normal bestimmt. Von den Überführungsprüfungen sei nur eine als Beispiel mitgeteilt.

Stromstärke 0,00016 Ampère durch 6 Stunden, am Schlusse Reaktion A sauer, K alkalisch, 50 ccm zur N-Bestimmung.

A	M	K
0,35	0,4	0,35

Eine selbständige Ladung von Pseudoglobulin ist durch elektrische Wanderung nicht erkennbar.

Es kann mithin als sicher gelten, daß im Organismus von den Salzen des Blutes und der Gewebsflüssigkeit stammende Hydroxylionen die Vermittler der elektronegativen Ladung ihrer Eiweißkörper bilden und man wird nicht fehl gehen, in den bekannten Schutzeinrichtungen gegen Säure- oder Alkaliüberladung der tierischen Säfte und Gewebe zugleich Regulierungsmechanismen für Maß und Sinn des elektrischen Eiweißzustandes zu erblicken.

Die Versuche über den elektrischen Transport von Proteinen unter verschiedenen Bedingungen wirken auch auf andere Fragen in dem schwierigen Gebiete der Eiweißfällungen überaus aufklärend. Für die Eiweißabscheidung durch Neutralsalze der Alkalimetalle[19]) war es gelungen, zu zeigen, daß dieselbe wohl durch die Summe der Wirkungen beider Ionen bestimmt wird, daß aber diese selbst in jedem Salze antagonistisch wirken, fällungsfördernd beziehungsweise hemmend. Überwog in einem Salze die erstere Ionenwirkung, dann zählte es zu den fällenden, wuchs die letztere, dann fällte es nicht mehr oder vermochte selbst die Wirkung anderer fallender Salze zu hemmen. Ob nun die Anionen oder Kationen Träger des Fällungsvermögens waren, konnte nicht unmittelbar neben dem Bestehen des Antagonismus abgeleitet werden. Die Tatsachen fügten sich bei passender Ordnung der Ionenreihe der einen oder der anderen Annahme. Da jedoch die allgemeine Erfahrung bei Säuren und Basen lehrte, daß positive H-Ionen eiweißfällende Eigenschaften besitzen, die den negativen OH-Ionen abgehen, so wurde es vorläufig als wahrscheinlich angesehen, daß auch bei der Alkalisalzfällung von nativem Eiweiß die Metallionen fällend, die Anionen als fällungswidrig wirken dürften. Durch den Nachweis der negativen Ladung von natürlichem Eiweiß erhält diese vorläufige Annahme eine wichtige Stütze. Denn nach mannigfaltigen Erfahrungen an den verschiedensten Kolloiden besitzt das fällende Ion eine dem Kolloide entgegengesetzte Ladung. In unserem Falle muß also das positive Metallion der Neutralsalze das koagulierende Ion darstellen. Verkehrt man durch Säurezusatz die Ladung von Eiweiß in eine positive, dann geht in Alkaliverbindungen das Fällungsvermögen auf die negativen Säureionen, das Hemmungsvermögen auf die Metallionen über.*)

Anläßlich früherer Untersuchungen über Albuminabscheidung durch Salze der Erdalkalien[20]) hatte sich eine auffallende Erscheinung ergeben. Während im nativen Eiweiß sich die Ionenreihe SCN, I, Br, NO_3, Cl usw. als fällungshemmend und zwar nach dem Maße dieser Wirkung abfallend und die Reihe Na, K, NH_4, Mg ebenso als fällungsbefördernd erwies, kehren sich bei Zusatz von Erdalkalien diese Verhältnisse um. Die Anionenreihe wird zunehmend gegen SCN fällungsbegünstigend, die Kationenfolge gegen Na hemmend. Da sich eine gleiche Umkehr der Ionenordnung auch bei Ersatz der Erdalkaliverbindungen durch

*) Weitere in Angriff genommene Fällungsversuche am dialysierten Eiweiß sollen noch einige offen gebliebene Fragen beantworten.

Säuren einstellt und die Erdalkalien durch Umsatz mit den Alkalikarbonaten und Phosphaten der nativen Eiweißlösung nachweislich Säuerung bewirken, so mußte die Erscheinung in beiden Fällen auf die relative Vermehrung der H-Ionen und damit einhergehende Umladung von Eiweiß bezogen werden. In der Tat hat Billitzer später an mit Erdalkalien versetztem, nativem Eiweiß kathodische Konvektion, also positive Ladung gefunden.

Neben der sicheren Einwirkung auf die Phosphate oder Karbonate konnte auch eine direkte Einwirkung der Erdalkalien auf Eiweiß unter Freiwerden von H-Ionen in Betracht gezogen werden. Diese von mir offen gelassene Möglichkeit wurde von P. Fraenkel[21]) einer experimentellen Prüfung unterworfen. Demselben gelang es zwar nicht, mit salzfreien Eiweißlösungen bei Chlorcalciumzusatz Reaktionsumschlag zu erzielen, wohl aber konnte er in diesem Falle mit einer Wasserstoffkette eine eintretende H-Ionenvermehrung dartun. So wertvoll die Feststellung einer unmittelbaren Wechselwirkung von Eiweiß und Erdalkalien wäre*), so dürfte derselben für unseren Fall eine praktische Bedeutung kaum zukommen. Unsere direkten Bestimmungen der Eiweißladung durch Salze der Erdalkalien zeigen, daß die letzteren eine erkennbare ladende Wirkung auf salzfreie Proteine nicht besitzen. Bei der gleichzeitig sichergestellten Bedeutung der Phosphate und Karbonate für die Elektrisierung von nativem Eiweiß muß das Phänomen der Verkehrung der Ionenfolge betreffend ihren fällenden und hemmenden Effekt allein auf die Umsetzung der Erdalkalien mit den Phosphaten und Karbonaten bezogen werden. Demgemäß lehrt auch der Versuch, daß mit salzarmem Eiweiß Chlorcalciumzusatz (1,0 n) und darauf zugefügtes Rhodannatrium keine Fällung erzeugen, während bei vorhergehender Ansäuerung Rhodansalz sofort einen mächtigen Niederschlag hervorruft.

Eine andere Erscheinung, auf die nun einiges Licht fällt, ist der Umstand, daß bei Säurezusatz zu nativem Eiweiß nicht das Bestehen von nachweisbarer saurer Reaktion sondern erst ein ge-

---

*) Leider zeigte das für diesen Versuch von Fraenkel verwendete Eiweiß infolge leichter Fäulnis alkalische Reaktion gegen Phenolphthalein und es ist anscheinend unterlassen worden, in diesem Falle auf einen Reaktionsumschlag bei Zusatz von $CaCl_2$ zu achten. Das erste Hühneralbumin Fraenkels zeigte einen solchen nicht; es ist jedoch nicht dieses, sondern das zweite, welches das positive Resultat der H-Ionenvermehrung in der Konzentrationskette ergab. Vielleicht klärt sich bei genauer Wiederholung der Versuche der auffallende Widerspruch der elektrischen und Indikatorprüfung auf.

wisser Grad derselben die aus der Verkehrung der Eigenschaften zugesetzter Ionen ersichtliche elektrische Umladung bewirkt.*) Auch hier zeigen die Überführungsversuche, daß Eiweiß die ihm mit Dinatriumphosphat und Mononatriumkarbonat erteilte elektronegative Ladung auch bei neutraler und sogar schwach saurer Reaktion behauptet und erst bei Erreichen eines höheren Grades von Azidität einbüßt. Damit dürfte beispielsweise im Einklange stehen, daß bei Versuchen an natürlichem Eiweiß [20]) und einer Säuerung mit 0,01 n-Salzsäure zugesetzte Anionen zumeist noch die Fällung hemmend, Kationen fördernd wirken, und dieses Verhalten sich erst bei 0,02 n-HCl und darüber vollständig umkehrt.

Zum Schlusse soll noch eine Frage der allgemeinen Eiweißchemie berührt werden, die in einem Zusammenhange mit dem elektrischen Zustande der Proteinstoffe stehen könnte. Bekanntlich liegt nach dem physikochemischen und, soweit es festgestellt werden konnte, analytischen Verhalten in den tierischen Flüssigkeiten ein Gemenge von mehreren Eiweißkörpern vor, die nach ihrer wechselseitigen Einwirkung auf Löslichkeit, Fällbarkeit, Koagulierbarkeit durch Hitze in einem gewissen Sinne sich den Eigenschaften einer Legierung nähern. Es wäre nun von höchstem Interesse gewesen, festzustellen, wieweit die Wechselbeziehungen der verschiedenen Proteine durch Differenzen elektrischer Art mitbedingt sind, zumal bei der Wechselwirkung amphoterer Kolloide, zu denen die Eiweißkörper gezählt werden müssen, das Auftreten von Umladungen und Entstehen elektrostatischer Anziehungskräfte theoretisch leicht möglich erscheint.[22]) Von diesem Gesichtspunkte wurden eine ganze Reihe mühevoller und sorgfältiger Versuche verwendet auf die Feststellung eines etwaigen Geschwindigkeitsunterschiedes in der elektrischen Wanderung des in unserem salzarmen Eiweiß enthaltenen Albumin und Pseudoglobulin durch quantitative Bestimmung dieser Komponenten. Auch Versuche mit anodischer (alkalischer) oder kathodischer (saurer) Eiweißlösung wurden ausgeführt.

Um genug Material zu gewinnen, wurde meist ein Doppelversuch durch Parallelschaltung zweier Überführungsapparate mit je drei Gefäßen angestellt, so daß zur Globulin- und Albuminbestimmung im A-, K- und M-Gefäß je zwei Proben von 40 ccm gewonnen werden konnten. Die Proben wurden mit Ammonsulfat halbgesättigt. Der abgesetzte Niederschlag wird abfiltriert und mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung

*) Hierher gehört wohl auch die Gegenerscheinung, daß die durch Calciumsalze erzeugte Umkehr der Ionenwirkung (z. B. Fällung durch SCN) bei mäßiger durch Laugenzusatz bedingter alkalischer Reaktion nicht aufgehoben wird.

sorgsam nachgewaschen. Filtrat und gelöster Niederschlag werden nach Ansäuerung mit Essigsäure völlig koaguliert, hierauf mit heißem Wasser ammoniakfrei gewaschen und nach Kjeldahl analysiert.

Dialysiertes Pferdeserum 3fach verdünnt, Strom 0,00002 Ampère durch 6 Stunden, kein Reaktionsunterschied in den Elektrodengefäßen.

	A	M	K
Globulin	8,3	8,4	8,25
Albumin	3,05	3,35	3,1
Summe	11,35	11,75	11,35

Der Versuch lehrt mit anderen gleichartigen, daß der fehlenden elektrischen Ladung der dialysierten Eiweißmischung ein Fehlen der Ladung ihrer einzelnen Komponenten entspricht.

Leider gab die Globulin-albumintrennung in anodischen bzw. kathodischen Eiweißlösungen keine eindeutigen Resultate, anscheinend, weil die Fällungsgrenzen in salzarmen Eiweißlösungen schon durch geringe Reaktionsunterschiede in hohem Maße beeinflußt werden. Es muß also die Frage offen bleiben, ob bei Ladung von Eiweißgemengen eine Differenz der Wanderungsgeschwindigkeiten der Komponenten besteht. Selbstredend dürfte der Nachweis einer solchen zu Rückschlüssen auf Unterschiede in der elektrischen Ladung nicht dienen, denn die Wanderung hängt noch von der Reibung der bewegten Teilchen, also in demselben Milieu von ihrer Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit ab.

Die elektrische Ladung der Eiweißkörper und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Umständen gewinnt nicht nur für das engere Gebiet der Eiweißchemie, sondern auch für mannigfache allgemeinere Probleme der Physiologie*), für Fragen der Histologie*), sowie auch für das weite Feld der Reaktionen der Immunsubstanzen**) eine hohe Bedeutung, worauf wir noch weiterhin wiederholt werden zurückkommen müssen.

Literatur.

1) Linder und Picton, Journal of chem. Society 1892, S. 160.

2) A. Coehn, Zeitschr. f. Elektrochemie 4, 63.

3) Zsigmondy, Ebenda 4, 546.

4) Bredig, Zeitschr. f. angew. Chemie 1898, S. 945.

5) Hardy, Zeitschr. f. physik. Chemie 33, 385. — Journ. of Physiology 24, 288.

6) Much, Römer und Siebert, Zeitschr. f. diätet. und physik. Therapie 8, 19.

*) Wird an anderer Stelle behandelt werden.

**) Darüber sind schon vor Jahresfrist Untersuchungen begonnen worden.

7) Billitzer, Zeitschr. f. physik. Chemie **51**, 130.
8) Bredig, Anorganische Fermente, Leipzig 1901.
9) Pauli, Diese Beiträge **6**, 233.
10) Biltz, Chem. Berichte **37**, 1095.
11) Landsteiner und Jagic, Münchener med. Wochenschrift **1903**, Nr. 27.
12) Neißer und Friedemann, Ebenda. 1904, Nr. 15 u. 19.
13) Starke, Zeitschr. f. Biologie **42**, 187.
14) W. Erb, Ebenda **41**, 309.
15) Bokorny, Pflügers Archiv **108**, 216.
16) M. Heidenhain, Das. **90**, 115.
17) Friedenthal, Zeitschr. f. allg. Physiologie **1**, 56.
18) P. Fraenkel, Pflügers Archiv **96**, 601.
19) Pauli, Diese Beiträge **3**, 225.
20) Pauli, Ebenda **5**, 27.
21) P. Fraenkel, Zeitschr. f. experim. Pathologie u. Therapie **1**.
22) Landsteiner und Jagic, Münchener med. Wochenschrift **1904**, S. 1185.

XXXV.

Über den Einfluß von Neutralsalzen auf Färbbarkeit und Fixierung des nervösen Gewebes.

(Ein Beitrag zur Kenntnis der Kolloide.)

Von **Emil Mayr** (Graz).

Aus dem physiologischen Institut zu Straßburg.

Nach einer unveröffentlichten Beobachtung von Dr. Bethe zeigen Rückenmarkstücke, welche 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gelegen haben, eine weitgehende Auflösung der Strangfasern. Dieser Befund, der in auffallendem Gegensatz zur bekannten konservierenden Eigenschaft dieser Flüssigkeit zu stehen schien, gab Veranlassung zu der vorliegenden Untersuchung. Eine größere Anzahl isotonischer Salzlösungen wurde darauf geprüft, ob sie Strangfaserauflösung geben oder nicht. Die Auflösungsgrade bei den einzelnen Salzen zeigten ziemliche Übereinstimmung mit den Angaben Loebs*) über Beförderung der Entwicklung von Limuluseiern und über die Beeinflussung der rhythmischen Muskelkontraktionen, sowie mit denen Overtons**) über die Erhaltung der Erregbarkeit des Froschmuskels. Es konnten sogar die gewonnenen Zahlen in Reihen gebracht werden, die mit den Angaben Hofmeisters***) über Quellung von Leim in Salzlösung und den Reihen Paulis†) für die Fällung von Eiweißkörpern sehr gut übereinstimmen. Ähnliche Reihen hatte auch Höber††) für die Steigerung oder Verminderung des Ruhestroms am Froschmuskel gefunden. Solche Reihen sind schon längere Zeit für die Veresterungsgeschwindigkeit von Säuren und die Inversion des Rohr-

---

*) J. Loeb, Beiträge zur Physiologie. Festschrift für Fick. 1899.

) Overton, Pflügers Archiv **105, 167 bis 290 (1905).

***) Hofmeister, Archiv f. exper. Pathologie u. Pharm. **25**, 1 (1889), **28**, 210.

†) Pauli, Diese Beiträge **3**, 225 (1905), **5**, 27 (1903), **6**, 233 (1905).

††) Höber, Pflügers Archiv **106**, 509 (1905); vergleiche auch: Höber und Gordon, Diese Beiträge **5**, 432 (1904).

zuckers bekannt, dann auch für Hitzekoagulation des Eiweißes usw. (Literatur siehe Höber).

Im Verlaufe der Untersuchung stellte sich heraus, daß manche Salze auch auf andere Gewebselemente einen Einfluß ausüben, vor allem auf die färbbaren Substanzen der Nisslschollen, der Glia- und Bindegewebskerne oder der Ganglienzellnukleoli; auch diese ließen sich in Reihen bringen, die aber in ihrer Anordnung und vor allem in ihrer Richtung von den obenerwähnten abweichen.

I. Methodik.

Frisch getöteten Hunden wurde das Rückenmark herausgenommen, von der Dura befreit und mit dem Rasiermesser in $^1/_2$ cm dicke Schnitte zerlegt. Diese Stücke wurden in die verschiedenen Salzlösungen (siehe Tabelle XXI) eingelegt, 24 Stunden darin belassen, und dann durch 96 proz. Alkohol, absoluten Alkohol, Xylol-Alkohol (4 : 1) und Xylol in Paraffin gebracht. Die 10 μ dicken Schnitte*) wurden auf die Objektträger mit Eiweißglycerin aufgeklebt**) und in 4facher Weise gefärbt: 1. mit Molybdän-Hämatoxylin [Bethe, Arch. f. mikrosk. Anatomie **55**, 525] (10', Auswaschen in frischem Brunnenwasser etwa 10' bis zur Blaufärbung); 2. Überfärbung mit alkalischem Toluidinblau***) nach Bethe; (Methode 1 und 2 geben Allgemeinfärbung, d. h. sie zeigen alles, was überhaupt noch an Gewebe vorhanden ist); 3. primäre Färbung mit Toluidinblau 1 : 1000***); 4. abgekürzte Nisslfärbung (10' in Toluidinblau, 10' Differenzieren in 96 proz. Alkohol).

Die Salzlösungen wurden isotonisch einer 0,85 proz. Kochsalzlösung hergestellt. Da Vorversuche gezeigt hatten, daß geringe Konzentrationsschwankungen keine wesentlichen Unterschiede ergeben, sah man von einer genauen Bestimmung des Dissoziationsgrades etwa mit dem Beckmannschen oder dem Kohlrauschschen Apparate ab und benutzte die bekannten de Vriesschen Koeffizienten: neutrale Alkalisalze organischer oder anorganischer Säuren:

1-basische Säure 3,
2- „ „ 4,
3- „ „ 5;

neutrale Erdalkalisalze:

2-basische Säure 2,
3- „ „ 4;

berechnet aus den Partialkoeffizienten:

für jeden Säurerest 2,
„ jedes Alkalimetall 1,
„ jedes Erdalkalimetall 0

(cit. nach Hamburger, osmotischer Druck und Ionenlehre **1**, 1902).

---

*) Um eine möglichst gleichartige Färbung zu erzielen, wurde stets eine größere Anzahl Schnitte verschieden vorbehandelter Blöcke auf einem Objektträger vereinigt.

) Einige Male, speziell bei nicht neutralen Lösungen, mußte die einfache Wassermethode oder die Bethesche Gummi-Benzin-Methode zum Aufkleben benutzt werden [Bethe, Diese Beiträge **6, 399 (1905).]

***) Bethe, Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems 1903, S. 135; Bethe, Diese Beiträge **6**, 401 u. 404 (1905).

II. Auflösung der Strangfasern.

Ein Rückenmarkstück, das 24 Stunden in physiologischer (0,85 proz.) Kochsalzlösung gelegen hat, zeigt bei Beizfärbung mit Molybdän-Hämatoxylin in einem Querschnitte ($^1/_2$ bis 1 mm unter der Blockoberfläche) die Axencylinder der intramedullären, motorischen Fasern, der sensiblen und motorischen Wurzeln und der peripheren Nervenfasern gut erhalten, während die Axencylinder der Strangfasern fast vollkommen verschwunden sind. Es zeigt sich in den Strängen ein leeres Glianetz; nur hin und wieder liegt in einer Gliamasche der Rest einer Strangfaser in Form eines kleinen Korns oder eines größeren Knollens.

Im Längsschnitt fehlen an den Schnittenden die Strangfasern vollkommen (leere Maschen); gegen die Mitte zu folgen der Reihe nach Zonen mit runden Kugeln, solche mit Spindeln oder Kugeln, die durch einen dünnen Faden kaum zusammenhängen, dann bloß unregelmäßig gequollene Fasern und endlich mehr oder weniger normale Fasern. (Vergleiche auf der Tafel Fig. 1 und 2. Siehe auch Tafelerklärung am Schluß.)

Die Lösungen der übrigen Salze gaben z. T. die gleichen Bilder wie Kochsalz (Kaliumchlorid, Kaliumrhodanid usw.), während andre die Strangfasern vollkommen intakt ließen (Magnesiumchlorid, Kadmiumchlorid) und ebenso gut konservierten, als wenn das Rückenmarkstück direkt aus dem Tierkörper in Alkohol gebracht worden wäre (Fig. 1). Noch andre Salze gaben Zwischenstufen (Natriumbromid, Kaliumbromid usw.).

Die Auflösung der Strangfasern geht in erster Linie vom Querschnitt des Rückenmarksstückes aus und zwar nicht an allen Stellen gleichmäßig. Am meisten in die Tiefe greift die Auflösung stets bei den Fasern, welche am weitesten von der Pia entfernt sind, so daß sich auf einem Längsschnitt durch die Mitte des Rückenmarks die Auflösungszone sichelförmig vom Querschnitt des Blocks nach Innen erstreckt. Die unverletzte Pia übt also entweder gegen den Eintritt der Salze oder wahrscheinlicher gegen den Austritt der Lösungsprodukte einen gewissen Schutz aus, der aber nicht absolut ist, denn man findet ganz dicht an der Pia häufig auf der ganzen Länge der Schnitte stark zerfallene Strangfasern auch an Stellen, wo die Fasern weiter nach Innen ganz intakt sind. Hieraus ist zu schließen, daß die Schädigung nicht allein am Querschnitt in die Fasern eindringt sondern auch ihre Hüllen durchdringt. Wenn sich also die

intramedullären, motorischen Fasern inmitten ganz aufgelöster Strangfasern intakt zeigen, so kann dies auf keine Weise dadurch erklärt werden, daß sie durch ihre Hüllen gegen die Salzlösung geschützt sind. Übrigens zeigen sie sich auch, ebenso wie die Wurzelfasern und peripheren Nervenfasern, am Querschnitt intakt.

Besonders stark und weit in die Tiefe greifend war stets die Auflösung der Hinterstrangaxencylinder. Ohne damit etwas präsumieren zu wollen, sei daran erinnert, daß sich die Hinterstrangsfasern auch bei pathologischen Prozessen besonders labil zeigen.

In einigen Fällen war ganz dicht am Querschnitt eine schmale Zone von erhaltenen Strangfasern; dann folgte eine Zone mit Auflösung und dann wieder mit erhaltenen Fasern, z. B. bei Dinatriumphosphat und Dikaliumphosphat usw.

Um die Grade der Auflösung vergleichen zu können, wurde von jedem Schnitt ein Bild eingestellt, welches unter Vermeidung von Randteilen und von Hinterstrangsfasern vom Querschnitt 1,5 mm nach einwärts reichte; dieses wurde mit dem Abbéschen Zeichenapparat auf Millimeterpapier roh skizziert. Die Länge des projizierten Bildes betrug mit Leitz Objektiv 3, Ocular 1, bei nicht ausgezogenem Tubus 15 cm. Die einzelnen oben beschriebenen Zonen wurden so gemessen und die Zahlen mit schätzungsweise gewonnenen Koeffizienten multipliziert: ganz leere Felder = 0, einfache Kugeln = $^1/_4$, Kugeln und spindelförmig gequollene Fasern gemischt = $^1/_3$, bloße spindelförmig gequollene Fasern = $^1/_2$, erhaltene Fasern = 1; man erhält so Zahlen, welche zwischen 0 und 15 liegen.

Die gefundenen Zahlen, auf beigefügter Tabelle zusammengestellt, zeigen eine im allgemeinen gute Übereinstimmung mit den Reihen Paulis*) und auch Höbers*). (Siehe Tabelle I auf S. 552.)

An dem einen Ende stehen die zweiwertigen Säuren (Sulfat, Tartrat) und das dreiwertige Citrat, auf dem anderen die einwertigen Halogensalze und das Nitrat; zwischen beiden Gruppen das Acetat und das neutrale Phosphat (vergleiche auch Hofmeister loc. cit.).

Die besondere Stelle, welche das Fluor bei der Eiweißfällung hat, nimmt es auch hier ein. Die Kationen verhalten sich ähnlich: $Li > Na > K > NH_4$, bei dem Mg dagegen scheint sich die fällende Wirkung umzukehren. Bemerkenswert ist auch die starke Fällung durch Lithiumchlorid. Während die Alkalisalze genauer und ausführlicher untersucht wurden, begnügte man sich bei den Erdalkali- und Schwermetallsalzen vorläufig mit Stichproben. Da die letzteren in der histologischen Technik vielfach mit Erfolg

*) Pauli, loc. cit., Höber, loc. cit.

benutzt werden, ist auch die gute Konservierung (= starke Fällung) nicht überraschend.

Tabelle I.

	Li	Na	K	NH_4	Mg	Ca	Al	Cd	Ni	Cu	Pb
Fl		15	15	13,5	3,5†)		14†)				
Tartrat	15	15	13,3				15				
Citrat		15									
SO_4	15	14,2	14	14	13,2				15*)	14*)	
Oxalat		15	13,5		13,5†		15†)				
Acetat		12*)							15*)	15*)	15*)
HPO_4		10,75	12	15							
Br		8,33	9,27	9,77							
NO_3		8,35	7,7		12,0						
CNS	2,2	6,95	4,3	4,25	14						
Cl	11,7	4,[illegible]	4,16		15	15		15*)		15*)	
J		4,5	4,1	4,75							

*) Winterversuche. †) In Wasser schwer löslich, daher nicht isotonisch.

Bei einem Vergleich der aufgestellten Versuchsreihen bemerkte man einen wesentlichen Unterschied nach der Jahreszeit, der darin bestand, daß bei Winterversuchen die Auflösung geringer war als bei Frühjahrs- und Sommerversuchen. Genauere Untersuchungen in dieser Richtung konnten aus äußeren Gründen nicht mehr durchgeführt werden und ich mußte mich mit einem Versuch mit Kochsalz und Calciumchlorid bei 10, 16 und 28° begnügen. Bei Kochsalz 10° waren die Auflösungen gering, bei 16° entsprachen sie ungefähr dem Wert 5, bei 28° waren sie nur unwesentlich größer. Bei Calciumchlorid waren auch bei der höchsten Temperatur keine Auflösungen zu konstatieren. Man kann also soviel sagen, daß die Fixierung der Strangfasern ebenso wie die Ausfällung von Kolloiden von der Temperatur abhängig ist. In die Tabellen wurden nur dann Zahlen aus den Winterversuchen aufgenommen, wenn keine anderen vorlagen; sie sind jedesmal mit einem Sternchen bezeichnet. —

Da nach Spiro*) saure oder alkalische Reaktion die Quellung und Lösung von Kolloiden wesentlich erhöht, wurden ähnliche Versuche angestellt. Saure und alkalische Salze zeigten keine eindeutigen Resultate:

*) Spiro, Diese Beiträge **5**, 276 u. ff. (1904).

Tabelle II.

	K	Na	NH_4
H_2PO_4	4,42	15	15
HPO_4	12	10,75	15
$-PO_4$	9,9	13	10,75

Dagegen zeigten isotonische Kochsalzlösungen mit geringen Mengen Zehntelnormal-Natronlauge oder Zehntelnormal-Schwefelsäure versetzt, so daß $^n/_{260}$ und $^n/_{10400}$ saure und alkalische Lösungen entstanden, eine geringe Zunahme der Erhaltung, und zwar saure Lösungen besser als alkalische:

Tabelle III.

NaCl allein	—	6,1
„ + NaOH	$^n/_{260}$ alkalisch	8,4
„ + „	$^n/_{10400}$ „	7,0
„ + H_2SO_4	$^n/_{260}$ sauer	12,4
„ + H_2SO_4	$^n/_{10400}$ „	12,3

Andere Flüssigkeiten verhielten sich verschieden. Destilliertes und Brunnenwasser lösten stärker als physiologische Kochsalzlösungen (dabei auch starkes Aufquellen der Blöcke) und bei letzteren schien der Zusatz geringer Mengen anderer Salze das Lösungsvermögen wesentlich zu beeinflussen (siehe Tabelle IV und V). Kochsalz in Brunnenwasser gelöst konservierte besser als in destilliertem Wasser. Vor dem Gebrauch gekochte Lösungen konservierten besser als ungekochte. Die Wirkung anderer „physiologischer“ Lösungen ist aus den Tabellen ersichtlich.

Benutzt wurde zuerst die von Overton*) angegebene Ringerlösung, welche aber für Kaltblüter gilt, weshalb die Versuche nicht ganz einwandsfrei sind. Aus der Tabelle IV ist hauptsächlich der Einfluß der Konzentration des zur Fixierung benutzten Alkohols ersichtlich. In geringen Alkoholkonzentrationen (40proz. Alkohol) löst sich offenbar noch manches aus dem Gewebe, wofür die geringe Menge der erhaltenen Strangfasern spricht, während bei sofortiger Einwirkung von 96proz. Alkohol eine reichliche Menge von Formen, Kugeln und Spindeln usw., erhalten ist, welche alle als unvollkommen gelöste, durch den eindringenden

*) Overton, loc. cit.

konzentrierten Alkohol plötzlich „in situ“ koagulierte Teile anzusehen sind. In 40proz. Alkohol geht die Koagulation sehr langsam vor sich, so daß inzwischen noch mancherlei aufgelöst werden kann, bevor der später hinzugefügte 96proz. Alkohol alles definitiv fällt.

Tabelle IV.

	40 proz. Alkohol	96 proz. Alkohol
dest. Wasser	2,25	5,12
dest. Wasser gekocht	2,5	3,42
Brunnenwasser gekocht	1,25	3,85
NaCl in Brunnenwasser	—	7,25
„ „ „ gekocht	—	9,25
NaCl in dest. Wasser gekocht	3,85	5
Ringer *α*	6,65	9,67

alle sind Winterversuche.

Bei späteren Untersuchungen wurde eine in den hiesigen Instituten allgemein verwendete Ringerlösung benutzt (0,8 g NaCl, 0,1 g Na_2CO_3, 0,1 g $CaCl_2$, 0,075 g KCl, 100 ccm aq. dest.), in der Tabelle kurz Ringer *β* genannt, zum Unterschiede von der Overtonschen Lösung (Ringer *α*).

Tabelle V.

NaCl 0,85 Proz.	6,1*)
$CaCl_2$ **)	15
KCl **)	4,16
NaCl + $CaCl_2$ (Verhältnis wie Ringer *β*)	3,75
NaCl + KCl „	11,2
NaCl + KCl + $CaCl_2$ „	4,9
Ringer *β*	3,0

*) In diesem Versuche auffallend hoch gegenüber den gewöhnlichen Werten von 4 bis 5.
**) aus Tabelle I.

Die kombinierten Salzwirkungen in Tabelle V (Ringerlösungen) lassen sich keineswegs durch einfache Addierung der lösenden und fällenden Einflüsse erklären, sondern lassen das Entstehen neuer Gesetzmäßigkeiten etwa durch Herabdrücken der Dissoziation bei Anwesenheit mehrfacher Cl-Ionen, oder durch Eintreten eines Erdalkaliions wahrscheinlich erscheinen.

Um weitere Aufschlüsse über die Natur dieser Auflösungen zu bekommen, wurden verschiedene Konzentrationen von solchen Salzen benutzt, die in „physiologischen" Konzentrationen stark auflösten.

Tabelle VI.

NaCl			
isot. / 2	5,1		
isot.	3,42	4,65	4,0
0,2 Mol.	9,1	7,55	
0,35 „	—	6,25	
0,5 „	12,75	13,62	
1 „	14	14,75	
2,5 „	—	15	
5 „	15	15	

Tabelle VII.

Na_2SO_4	
0,014 Mol.	8,05
0,028 „	8,8
0,109 „ (isot.)	11
0,14 „	15

Mit dem Steigen der Salzkonzentrationen wird die Fixierung eine bessere, bei maximalen Konzentrationen (gesättigten Lösungen) ist die Konservierung eine vollkommene. Diese verhält sich augenscheinlich analog den Fällungen der Eiweißkörper durch Ammonsulfat usw. (Tabellen VI und VII). In Alkohol (24 Stunden) fixierte Blöcke geben nachträglich in isotonische Kochsalz- bzw. Natriumsulfatlösung gebracht keine Strangfaserauflösung. (Tabelle VIII.)

Bei der Auflösung der Strangfasern kann es sich bloß um dreierlei handeln: Bakterielle Einwirkung, Zersetzung der Gewebselemente durch im Gewebe vorhandene Fermente (Autolyse) oder rein physikalische Auflösung in der Salzlösung. Gegen das erste spricht schon der Umstand, daß bei einer Reihe stark antiseptisch wirkender Lösungen starke Auflösung stattfand und umgekehrt. Es bleibt also die Alternative übrig: Autolyse oder Salzwirkung.

Tabelle VIII.

NaCl	3,42
NaCl + 2 Proz. Gummi	5,66*)
eigenes defibriniertes Blut	2,5
24^h in feuchter Kammer	fast 15
24^h im Tier { Schnittende	15
24^h im Tier { Mittelstück	15
24^h im Tier, dann 24^h in feuchter Kammer	15
24^h Alkohol, dann 24^h NaCl	15
24^h Alkohol, dann 24^h Na_2SO_4	15

Auf der Tabelle VIII sind mehrere darauf sich beziehende Versuche dargestellt. Stücke, 24 Stunden in feuchter Kammer bei Zimmertemperatur gehalten, zeigen fast keine Auflösung; ebensowenig Stücke, die 24 Stunden im toten Tiere im Wirbelkanal, von Dura, Knochen und Weichteilen bedeckt, gelegen hatten (allerdings im Eisschrank), und zwar weder das freie Schnittende noch das Mittelstück; auch ein 24 Stunden im Tier und dann noch 24 Stunden in feuchter Kammer gelegenes Stück zeigte keine Auflösung. Ein im Gewebe selbst befindliches Agens kann also nicht der Grund der Auflösung sein. Man vergleiche übrigens auch folgenden Versuch: Längere Stücke eines Hunderückenmarkes wurden in physiologischer Kochsalzlösung durch 20 Stunden auf je 45, 56, 75, 98° C erhitzt, dann wurde die eine Hälfte direkt in Alkohol gebracht, die andere vorher 24 Stunden in Kochsalzlösung belassen. Bei 45 und 56° C erfolgte noch teilweise Lösung, also war die Koagulation nicht vollständig, während mit steigenden Temperaturen keine Auflösung mehr erfolgte, wohl aber die Veränderungen immer deutlicher wurden, die sich auch nach direkter Übertragung (aus der heißen Kochsalzlösung) in Alkohol als Schrumpfung, Segmentierung und Bildung von Rosenkranzformen präsentierten. (Siehe Tabelle IX.)

Im Gewebe ist das auflösende Agens nach den angeführten Versuchen nicht gelegen (Versuch am toten Tier, in der feuchten Kammer); folglich wäre die Auflösung durch Salzeinwirkung sehr wahrscheinlich, wenn nicht die am meisten physiologischen Medien (Ringer, defibriniertes Blut) noch stärker als reine Kochsalzlösung auflösten, so daß auf eine physiologische Komponente geschlossen werden kann.

*) Albanese, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 32, 297.

Tabelle IX.

	NaCl-Fixierung	Alkoholfixierung	
direkt NaCl (kontroll.)	5,2	—	
direkt Alkohol (kontroll.)	—	15	
auf 45° erhitzt	7,3*)	15	*) Rand erhalten.
„ 56° „	12,42	15	
„ 75° „	15	15	unregelmäßige Schrumpfung.
„ 98° „	15	15	Rosenkranzformen vorherrschend.

Folgende Auffassung würde dem entsprechen: die Fermentwirkung schreitet bekanntlich in einer Richtung fort, bis die Konzentration der Spaltungsprodukte einen gewissen Grad erreicht hat und dann Stillstand eintritt; in der feuchten Kammer ist bei der geringen Flüssigkeitsmenge diese Konzentration schnell erreicht und die Auflösung ist daher minimal und optisch nicht erkennbar. Bei Anwesenheit einer größeren Flüssigkeitsmenge (20 ccm) ist die Konzentration der Spaltungsprodukte aber eine geringe, daher wird das Gleichgewicht sehr spät erreicht und die Auflösung eine mehr weniger intensive.

Für die Erklärung der wechselnden Löslichkeit der Spaltungsprodukte muß man aber doch wieder die Salzwirkung in Anspruch nehmen. Es ist zwar bekannt, daß einzelne Neutralsalzlösungen die Fermentwirkung beeinflussen [verdünnte Lösungen befördern, bei erhöhter Konzentration tritt Hemmung ein, die sich bis zur vollständigen Aufhebung steigern kann*)], doch sind solche Gesetzmäßigkeiten wie die hier festgestellten bis jetzt nicht nachgewiesen.

Der Versuch mit höheren Temperaturen (Tabelle IX) gab keine eindeutigen Resultate, da gleichzeitig zwei Faktoren verändert wurden: das aufzulösende bzw. zu spaltende Substrat und das eventuell anwesende Ferment. Ein Vergleich mit den von Halliburton**) bestimmten Koagulationstemperaturen der einzelnen Eiweißkörper des Nervengewebes zeigt folgendes: Ein Neuroglobulin koaguliert bei 47°, nach Erhitzen des Rücken-

*) Fermi und Pernossi, Zeitschr. f. Hygiene **18**, 96 (1894), cit. nach Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkungen, 1901.

) Halliburton, Journal of physiology **15, 70 bis 107.

markes auf 45° erfolgt noch ziemlich starke Auflösung. Das Neuroalbumin koaguliert bei 56 bis 60° C.; dem entspricht eine geringe Auflösung bei 56°. Ein zweites Neuroglobulin koaguliert bei 75° C, ein entsprechend erhitztes Stück gibt an physiologische Kochsalzlösung nichts mehr ab.

Ist ein Ferment anwesend, so wird es selbstredend durch erhöhte Temperatur zerstört. Von einigen hier in Betracht kommenden sind die Zerstörungstemperaturen bekannt*): Pepsin wird unwirksam bei 55 bis 57° C, Trypsin verliert seine Wirksamkeit in schwach alkalischer Lösung erst bei 50°, während es in neutraler Lösung schon bei 45° C zerstört wird, von cytolytischen Agentien im Blute (Bakteriolysine und Hämolysine) wird das Komplement bei 56° zerstört. Über Einfluß der Temperatur auf autolytische Fermente waren keine genaueren Angaben aufzufinden. Die Widerstandsfähigkeit der Fermente wird allerdings durch Lösung in Wasser oder durch Beimengung von Substraten, auf welche das Ferment einwirkt, bedeutend gesteigert, doch soll bei 70° jede Wirksamkeit aufhören.

Trotzdem also darnach die Möglichkeit einer Fermentwirkung nicht ausgeschlossen werden kann, so spricht doch der Umstand dagegen, daß in verschiedenen Flüssigkeiten z. B. im Blut die Fasern dicht am Querschnitt erhalten bleiben, während es im Innern des Blockes zu starker Auflösung kommt.

Für Salzwirkung spricht die gute Übereinstimmung der bei der Auflösung gefundenen Reihen mit denen Paulis bei Ausflockung von Eiweiß; auch die gute Konservierung in konzentrierten Lösungen und in Schwermetallsalzlösungen, sowie die Unlöslichkeit der alkoholgefällten Strangfasern in Lösungen von Natriumsulfat und Chlornatrium läßt die Eiweißnatur dieser Gebilde wahrscheinlich erscheinen.

III. Elektive Färbung.

Während bei der Färbung mit Molybdän-Hämatoxylin oder alkalischem Toluidinblau das gesamte fixierte Gewebe durch Färbung sichtbar gemacht wurde und Fixierbarkeit = Färbbarkeit gesetzt werden konnte, tritt sowohl bei der primären Färbung nach Bethe als auch bei der vereinfachten Nisslfärbung das Auswahlsvermögen der einzelnen Gewebselemente für den Farbstoff in den Vordergrund (elektive Färbung). Wenn wir ohne Rücksicht auf die einzelnen Theorien der Färbung zwei Momente

*) Die folgenden Angaben sind aus Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkung, entnommen.

herausgreifen, die bei dem Färbungsvorgange in Betracht kommen, so sind es: 1. der Eintritt des Farbstoffes aus dem einen Medium (Farblösung) in das andere (Gewebe), 2. das Festhalten des Farbstoffes im Gewebe beim Waschen mit Wasser bzw. Alkohol.

Die Salzlösung kann aus dem komplizierten System, welches eine Vorderhornganglienzelle darstellt, entweder gewisse Stoffe herauslösen oder andere aus der Gewebsflüssigkeit niederschlagen; außerdem können zwischen Salzlösung und Gewebe chemische Umsetzungen vor sich gehen, die neuartige Körper entstehen lassen, und endlich wissen wir durch Spiro*), daß sich bei Kolloidsalzfällungen, als welche wir nach dem Vorhergehenden den ganzen Vorgang doch wohl ansehen dürfen, das fällende Salz entsprechend dem Nernstschen Verteilungssatz zwischen Lösung und Fällung verteilt.**) Daß jeder dieser aufgeführten Vorgänge imstande ist, die Bedingungen für die zwei oben erwähnten Momente zu verändern und vorhandene Affinitäten für Farbstoffbindung, welcher Natur immer, zu vernichten oder neue solche Affinitäten herzustellen, ist sehr wahrscheinlich. Von den Schwermetallen ist dies wohlbekannt und wird in der histologischen Technik weitgehend benutzt.

Trotz dieser höchst komplizierten Verhältnisse gehen wir von der Vorstellung aus, daß einheitliche Substanzen die Träger der Färbbarkeit in den einzelnen morphologischen Elementen sind; die weiter unten mitgeteilten Versuche stehen damit in ziemlicher Übereinstimmung.

Die Färbungsintensität wurde nach einer Farbskala geschätzt, die aus 9 Farbintensitäten bestand, von welchen die folgende immer doppelt so dunkel war, als die vorhergehende (siehe Bethe, Diese Beiträge **6**, 400).

1. Primäre Färbung der Axencylinder***).

Diese ist bei den meisten neutralen Salzen gegenüber dem einfachen Alkoholpräparat unverändert, d. h. die intramedullären motorischen Fasern, die Axencylinder beider Wurzeln und der peripheren Nerven, die Ganglienzellen und das Grau sind gefärbt,

---

*) Spiro, Diese Beiträge **4**, 300.

**) Die Verteilungskonstante von Salzen zwischen 2 Phasen richtet sich nach der Konzentration der neutralen (nicht dissoziierten) Moleküle. Diese ist in einer großen Menge Wassers wegen der starken Dissoziation eine sehr geringe, daher muß nach wiederholtem Abspülen der Schnitte mit Wasser alles nicht chemisch gebundene Salz aus dem Gewebe entfernt sein.

***) Bethe, loc. cit.

die Strangfasern aber ungefärbt, auch dann, wenn sie vollkommen erhalten sind.

Zu bemerken ist die Totalfärbung aller Strangfasern bei Fixierung in den alkalischen Flüssigkeiten: Natriumkarbonat und basisches Natriumphosphat, während in basischem Kalium- und Ammoniumphosphat die Strangfasern nur an den Randteilen gefärbt sind. In schwach alkalischen Kochsalzlösungen ($^{n}/_{260}$ und $^{n}/_{10400}$) (ebenso auch in entsprechenden schwefelsauren Lösungen) werden aber die Strangfasern nicht primär färbbar. Bei den Fixierungen mit Schwermetallsalzen (Kadmiumchlorid, Kupfersulphat, Kupferacetat, Bleiacetat und zum Teil bei Aluminiumsalzen) ist Allgemeinfärbung zu konstatieren (z. T. wohl auf Beizung beruhend). Bei allen untersuchten Magnesiumsalzen (Cl, Fl, CNS, NO_3, SO_4) (bis auf das Oxalat, welches allerdings in Wasser schwer löslich ist und deshalb als Suspension verwendet wurde) war keine primäre Färbbarkeit der sonst sich färbenden Axencylinder (motorische und periphere) zu konstatieren.

In Natriumsulphat-, Lithiumsulphat- und Lithiumtartratpräparaten waren in der weißen und grauen Substanz färbbare Klumpen und Körnchen gleichmäßig verteilt, die wohl mit den von Nissl*) beschriebenen, als Reste von Markscheidensubstanzen angesprochenen, identisch sind; im Nisslpräparate fehlen sie.

2. Nisslschollen.

Nach dem abgekürzten Nisslverfahren (Toluidinblau 10 Minuten, Alkoholdifferenzierung 10 Minuten) behandelte Präparate zeigen im nur mit Alkohol fixierten Block, wie bekannt, neben einer Färbung der Kerne und Kernkörperchen eine intensive Färbung der färbbaren Substanzportionen im Ganglienzelleib (Nisslschollen). Bei der Vorbehandlung der Blöcke mit gewissen Salzlösungen zeigen diese Schollen die gleichen Form- und Färbungseigenschaften wie im reinen Alkoholpräparat, während sie unter der Einwirkung andrer Salzlösungen ihre Färbbarkeit ganz oder teilweise verlieren (eventuell auch ihre Form und Anordnung ändern). Man vergleiche Fig. 4 und 5 der Tafel.**) Nach der Intensität der Färbung (ohne Rücksicht auf die feinere Struktur) konnte ich die Salzlösungen in Reihen bringen, die eine ähnliche Anordnung wie die für Strangfaserauflösung gefundene zeigen.

*) Nissl, Artikel „Nervenzellen" in Encyklopädie der mikroskopischen Technik **2** (1903).

) Abnahme der Färbbarkeit der Nisslschollen in Kochsalzlösung hat bereits Bühler beobachtet [Verhandl. d. phys.-med. Gesellschaft Würzburg **31 (1898)].

Tabelle X.

	Li	Na	NH_4	K	Mg	Al	Ca	Ba	Cd	Cu	Pb	Ni
Acetat		7, 8 (6, 7, 8)								4-5 *)	7-8 *)	
Cl	3 (2-4)	5-6 (4-7)	6-7 *)	8	6		6-7 *)	7 *)	6 *) (3-7)	7-8 *)		
NO_3		5-6 *) (4-8)		6 (4-7)	8							
CNS	2-3 (0-5)	5-6 (4-7)	4-5 (3-6)	5-6 (4-7)	8							
Br		4-5 (2-6)	3-4 (1-6)	5-6 (3-7)								
Tartrat	3 (0-5)	4 (2-6)		4 (3-6-7)		8						
Fl		3-4 (0-4, 3-6)	4-5 (2-8)	4 (2-7)	6†) (5-7)	6†) (5-7)						
J		3 (0-6)	4 (2-6)	4 (1-7)								
HPO_4		1-2 (0-3)	2 (0-5)	3 (1-5)								
Oxalat		0-1 (0-2)	2 (1-3)	2 (1-3)	7-8†)	7†) (6-8)						
SO_4	0-1 (0-2)	0	0	0	7-8					8 *)		8 *)
Citrat		0										

*) Winterversuche.

†) In Wasser schwer löslich. Die uneingeklammerten Zahlen bedeuten Durchschnittsintensität der Färbung, die eingeklammerten Zahlen die äußersten beobachteten Färbungsextreme.

Der Unterschied ist auffallend. Während bei den Strangfasern die Zahlen von Cl < CNS nach dem SO_4 steigen, fallen sie hier nach dieser Richtung ab; ebenso ist bei der Kationenreihe statt des Steigens nach dem Li zu ein Aufsteigen von Li nach Mg erkennbar. Auch ist die Reihenfolge nicht dieselbe: Fl und J, die bei den Strangfasern an beiden Enden standen, sind hier in die Mitte, das Acetat aus der Mitte an das fällende Ende der Reihe gekommen. Im allgemeinen ist doch die Tendenz: einwertige Anionen auf der einen und zweiwertige auf der anderen Seite, ziemlich ausgesprochen (Ausnahme: Tartrat).

So wie die Auflösung der Strangfasern der Paulischen Reihe bei Alkalisalzfällungen entsprach, so zeigt diese Reihe hier eine große Ähnlichkeit mit der von Pauli bei Erdalkalisalzfällungen oder mit 0,03 n-HCl angesäuerten Alkalisalzfällungen gefundenen; nämlich Umkehrung der Reihe von Fl > SO_4 . . . > Cl > J

und Li > Na > K > NH_4 auf Cl > NO_3 > . . . > Oxalat > SO_4 und NH_4 > K > Na > Li. —

Einwirkung der Konzentration:

Tabelle XI.

	Nisslschollen	Struktur	Kerne	Kernkörperchen	Anmerkung
NaCl isot.	7	tz—d	6	8	
„ 0,2 Mol.	6	k—d	6 (5—7)	6	tz = netzig
„ 0,35 „	5 (3—6)	sch—d	6 (5—7)	8	d = diffus
„ 0,5 „	5	b	6	7	sch=schollig
„ 1,0 „	4 (0—5)	b	6	7	b = bestäubt
„ 2,5 „	6 (5—7)	sch—d	6	7	k = körnig
„ 5,0 „	7	sch—k	6—7	7—8	

Bei Kochsalz ist also eine zunehmende Depression mit steigender Konzentration zu beobachten, welche bei weiterem Steigen wieder abnimmt. Die Werte von Alkoholblöcken (Intensität = 8) werden auch bei stärkster Konzentration nicht erreicht. (Siehe Tab. XII auf S. 563.)

Natriumsulfat (Tab. XII) zeigt bei minimaler Konzentration bereits starke Herabsetzung der Nisslfärbbarkeit, aber erst bei einer bestimmten Konzentration (0,14 bis 0,28 Mol.) wird die Aufhebung komplett. Bei weiterem Ansteigen der Salzmengen nimmt dann die Färbungsintensität wieder erheblich zu.

Von Held*) rührt die Angabe her, daß die Substanz der Nisslschollen in alkalischen Fixierungsmitteln (alkalischem Alkohol) nicht gefällt wird und daß die Nisslschollen, wenn bereits durch Alkohol usw. fixiert, durch Alkalien ganz gelöst werden; folgende Versuche haben darauf Bezug: Isotonische Kochsalzlösung, die schwach sauer ($^n/_{260}$ und $^n/_{10400}$ H_2SO_4) war, gab Färbungsintensität 7 der Nisslschollen, schwach alkalische Lösungen ($^n/_{260}$ und $^n/_{10400}$ NaOH) 6 bis 7 Intensität; also besteht keine wesentliche Differenz zwischen geringen OH- und H-Ionenkonzentrationen. Ausgesprochen alkalische Salze wie Triphosphate (Tab. XIII) und Natriumkarbonat gaben vollkommene Auflösung.

*) Held, Archiv für Anatomie 1895, S. 396. Bethe, loc. cit.

Mit Beizfarben (Molybdän-Hämatoxylin) behandelte Schnitte zeigten aber jedesmal erhaltene Nisslstrukturen, so daß eine Bildung von Löchern im Sinne Helds nicht stattfindet, sondern nur die Lösung einer primär färbbaren Komponente*) der Nisslschollen unter Zurücklassung ihres Substrates angenommen werden kann.

Tabelle XII.

Na_2SO_4	Nissl-schollen	Struktur	Kerne	Kern-körper
0,014 Mol	1 (0—3,4)	d	5 (4—6)	5
0,028 „	1 (0—4,5)	sch—d	5 - 6	6
0,035 „	2 (0—6)	„	4	7
0,07 „	1 (0—4)	k - d	4—5	6
0,098 „	1 (0—3)		5—6	6
0,109 „ (isot.)	1 (0—4)		4—5	6—7
0,14 „	0 (0—2)		5—7	7
0,28 „	0 (0—1)		5—6	6—7
0,56 „	0 (0—1)		4—5	7
1,12 „	4—5 (2—6)	sch—d	5—7	7
2,24 „	7 (5—8)	sch—d	5 - 7	6 - 7

Abkürzungen siehe Tabelle XI.

Tabelle XIII.

	Na	NH_4	K
H_2PO_4	6 (5—7)	6 (5—7)	8
HPO_4	1—2	2	3
PO_4	0	0	0

Um einigen Aufschluß über die Natur des färbbaren Stoffes in den Schollen zu gewinnen, wurden bereits in Alkohol fixierte Blöcke je 24 Stunden in Natriumsulfat- bzw. Kochsalzlösung,

*) Bethe, Diese Beiträge 6, 417.

dann ein in Magnesiumsulfatlösung fixierter Block 24 Stunden in Natriumsulfatlösung gebracht und wie gewöhnlich weiterbehandelt.

Tabelle XIV.

	Nisslschollen	Struktur	Kerne	Kernkörper
Alkohol	8	sch	6, 7	9
Alkohol – Na_2SO_4	0		4, 5	8
Na_2SO_4	0		3—4	8
Alkohol—NaCl	5 - 6	sch	5, 6, 7	7
NaCl	6—7	tz—d	5—6	8
$MgSO_4$—Na_2SO_4	6 (5—7)	k—sch	2—3	8
$MgSO_4$	7—8	sch	8	8—9

Abkürzungen siehe Tabelle XI.

Die primär färbbare Substanz der Nisslschollen wird also durch den Alkohol nicht so stark verändert, daß sie sich nicht noch in Natriumsulfat auflösen würde. Auch in Kochsalzlösung löst sich die durch Alkohol gefällte Substanz noch auf, während sich die durch Magnesiumsulfat gefällte selbst in Natriumsulfatlösung nur noch unwesentlich ändert. Auffallend ist noch die starke Lösung der färbbaren Substanz des Kernes in $MgSO_4$ und Na_2SO_4.

Man beachte auch die geringen Veränderungen, welche die Färbeaffinitäten durch Autolyse erfahren:

Tabelle XV.

	Nisslschollen	Struktur	Kerne	Kernkörper
Alkohol	8 (7)	sch	7 (6—8)	9
feuchte Kammer 24^h	5—6	sch – d	7 (6—8)	9
Tier 24^h	6—7	sch – d	7 (6—8)	9
Tier 24^h—feuchte Kammer 24^h	7	sch	7 (6—8)	9

Abkürzungen siehe Tabelle XI.

Hier soll noch über folgendes Phänomen berichtet werden: bei Kaliumoxalatfixierung sind bei gutgefärbtem Kern und Kernkörperchen die Nisslschollen ungefärbt. Außerhalb der Zellen dicht um den Zellkörper herum liegen zahlreiche Körner und Körnchen von tiefblauer Farbe. (Vorher gelöst gewesene und dann niedergeschlagene Nisslsubstanz? Vergleiche Held loc. cit.)

3. Kerne und Kernkörperchen.

Wie die Färbbarkeit der Nisslschollen verändert sich auch die der Kerne (Glia- und Bindegewebskerne) und der Kernkörperchen der Ganglienzellen in manchen Salzlösungen sehr beträchtlich. Manche Salze vermindern die Färbbarkeit aller drei Elemente gleich stark, während sich bei andern Salzen wesentliche Differenzen*) ergeben. Infolge dessen stimmen die Reihen für die Kerne und Kernkörperchen weder miteinander noch mit der für die Nißlschollen aufgestellten überein, wenn auch im großen Ganzen eine Ähnlichkeit besonders in der Richtung der Intensitätsveränderung zu bemerken ist.

Ordnet man die Intensitätswerte der Kerne und Kernkörperchen genau nach den Zahlen, so bekommt man glatte Reihen nur dann, wenn man die Reihen in der Mitte abbrechen läßt. Bei dieser Anordnung zeigt sich eine deutliche Inversion bei den Salzen der Schwermetalle und des Aluminiums und Magnesiums (Tabelle XVIa und XVIIa).

Tabelle XVIa.

Kerne.

	K	K	NH_4	NH_4	Na	Na	Li	Cu	Mg	Al
Acetat					7—8			6*)		
Fl	7—8		7—8		6				2†)	1—2†)
J	7		4		6—7					
Oxalat	5—6				4—5				2—3†)	2†)
Cl	5		4*)			6	3—4	8*)	6—7	
Tartrat	5—6					5—6	4			7—8
CNS		8		6		4—5	4—5		6—7	
HPO_4		8		4		5				
NO_3		6—7				8*)			8	
Br		6		3		4				
SO_4		4		2—3		3—4	3	8*)	8	
Citrat						2				

*) Winterversuche. †) In Wasser schwer löslich.

*) Dabei ist zu bemerken, daß die Färbungsintensitäten stets an einem und demselben Schnitt und an dicht neben einander liegenden Ganglienzellen und Kernen bestimmt wurden.

Tabelle XVIIa.
Kernkörperchen.

	K	K	NH_4	NH_4	Na	Na	Li	Cu	Mg	Al
Acetat					9			4—5		
Fl	9		9		9				6†)	3—4†)
J	9		8		9					
Oxalat	8				7				7†)	4†)
Cl	7—8		9*)			8	8-9	9	9	
SO_4	6		8			8	7	9	9	
Tartrat	7					7—8	6—7			8
C NS		9				8	5—6		9	
H PO_4		8		8		8				
NO_3		8		8		9*)			9	
Br		8		6—7		7				
Citrat						7				

*) Winterversuche. †) In Wasser schwer löslich.

Da dieses Abbrechenlassen der Reihen aber wohl nicht einwandfrei ist, geben wir hier zwei andre Reihen (Tabelle XVIb und XVIIb), welche hauptsächlich nach den Kaliumsalzen geordnet sind und den Vorzug haben, daß die zweiwertigen Anionen das eine Ende einnehmen.

Tabelle XVIb.
Kerne.

	K	NH_4	Na	Li	Mg	Al	Ca	Ba	Cd	Cu	Pb
Acetat			7—8							6*)	4*)
Fl	7—8	7—8	6		2†)	1-2†)					
CNS	8	6	4—5	4—5	6—7						
HPO_4	8	4	5								
J	7	4	6—7								
NO_3	6—7		8*)		8						
Cl	5	4*)	6	3—4	6—7		8*)	5-6*)	6*)	8*)	
Br	6	3	4								
Tartrat	5 6		5—6	4		7—8					
Oxalat	5—6		4—5		2-3†)	2†)					
SO_4	4	2—3	3—4	3	8					8*)	
Citrat			2								

*) Winterversuche. †) In Wasser schwer löslich.

Tabelle XVIIb.
Kernkörperchen.

	K	Na	NH_4	Li	Mg	Ba	Cd	Al	Cu	Pb	Ni
Acetat		9							4-5*)	7-8 *)	
Fl	9	9	9		6 †)			3-4 †)			
J	9	9	8								
CNS	9	8		5—6	9						
NO_3	8 (9)	9 *)			9						
HPO_4	8	8	8								
Cl	7—8	8	9 *)	8—9	9	9	6		9 *)		
Br	8	7	6—7								
Oxalat	8	7			7 †)			4 †)			
SO_4	6	8	8	7	9				8-9*)		8 *)
Tartrat	7	7-8		6—7				8			
Citrat		7									

*) Winterversuche. †) In Wasser schwer löslich.

Die manchmal auffallend niedrigen Zahlen bei Erdalkali- und Schwermetallsalzen (Mg, Ba, Ca, Al, Cu, Pb, Cd) können sich nur zum Teil aus der manchmal sauren Reaktion der Lösung erklären lassen; beachtenswert ist die schwache Färbung bei jenen Mg- und Al-Salzen, die in Wasser schwerlöslich sind.

Der Einfluß der Schwermetallkationen scheint über den der Anionen wie bei der Eiweißfällung so auch hier im allgemeinen zu überwiegen, so weit aus den wenigen Zahlen geschlossen werden darf; so wie dort sich die Fällung im Überschuß von Fällungsmittel oder von Eiweiß auflöst, so kann es auch hier durch ein günstiges Verhältnis zwischen der Salzlösung und der zu fixierenden Substanz zu keiner oder geringer Fällung kommen, wodurch die geringen Färbungsintensitäten erklärt wären.

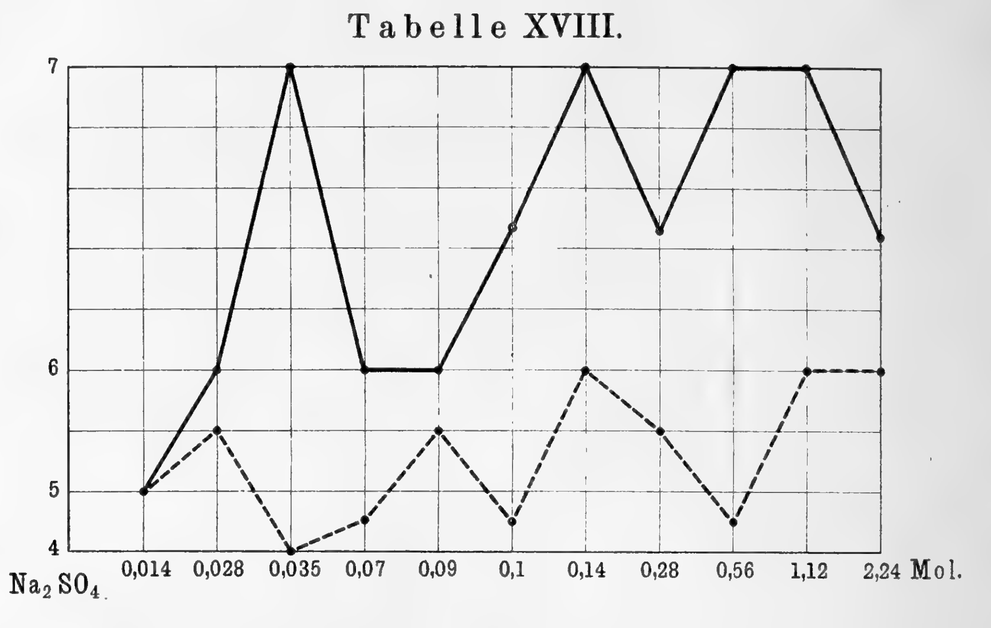
Das ganz verschiedene Verhalten der einzelnen Kationen entspräche auch den verschiedenen Fällungstypen, wie sie von Pauli*) für Zinkulfat, Silbernitrat und Kupfersulfat festgestellt und durch Eintreten des Metallions in das Eiweißmolekül erklärt wurden.

Daraus kann man wieder auf eine Verschiedenheit der färbbaren Substanzen der Glia- und Bindegewebskerne und der

*) Pauli, Diese Beiträge 6 (1905) loc. cit.

Nucleoli der Ganglienzellen schließen, was durch Vergleiche dieser beiden Elemente bei verschieden konzentrierten Natriumsulfatlösungen bestätigt werden kann.

Tabelle XVIII.



In Tabelle XVIII sind die Färbungswerte der Kerne (punktiert) und der Kernkörperchen (ausgezogen) als Koordinaten bei verschiedenen Konzentrationen von Natriumsulfat eingetragen. Es resultiert eine eigenartige Zickzacklinie, deren genauere Bestimmung wohl wünschenswert wäre.

Die einzelnen Phosphate ergeben keine eindeutigen Resultate (Tabelle XIX und XX), und Autolyse bewirkt keine wesentlichen Abweichungen vom Alkoholpräparat (Tabelle XV).

Fast überflüssig zu erwähnen ist noch, daß Schrumpfung der einzelnen Elemente die Färbungsintensität wesentlich stärker erscheinen lassen kann. Tabelle XXI zeigt aber, daß dadurch die Regelmäßigkeiten der Färbungsintensitäten keineswegs erklärt werden.

Tabelle XIX.
Kerne.

	Na	K	NH_4
H_2PO_4	6	8	2—3
HPO_4	5	8	4
PO_4	4—5	7—8	3

Tabelle XX.
Kernkörperchen.

	Na	K	NH_4
H_2PO_4	8	8	7—8
HPO_4	8	8	8
PO_4	9	?	8

Wenn sich auch im großen Ganzen die Färbbarkeit der Nißlschollen mit denen der Gliakerne und Kernkörperchen der Gang-

lienzellen unter den verschiedenen Salzeinflüssen ähnlich verändert, so treten doch bei manchen Salzen große Unterschiede zutage. Es kann daraus nur der Schluß gezogen werden, daß die färbbaren Substanzen verschiedener Natur sind, wie das auch schon, wenn auch weniger prägnant, aus den Versuchen anderer Autoren hervorging. Man vergleiche dazu Magnesiumoxalat, Kaliumoxalat (siehe Tafel) sowie Aluminiumfluorid, Ammoniumrhodanid, Magnesiumfluorid, Diammoniumphosphat usw. (Tabelle XXI).

Zusammenfassung.

Die vorgebrachten Befunde lassen sich am leichtesten von einem Gesichtspunkte betrachten: wenn man sich nämlich das Gewebe als ein inhomogenes System*) im Sinne der physikalischen Chemiker vorstellt, welches aus mehreren verschiedenartigen festen, gequollenen und flüssigen Phasen besteht, die sich in einem bestimmten Gleichgewichtszustande befinden. Durch Zufuhr einer Salzlösung verändert sich dieser Gleichgewichtszustand und wird nach einiger Zeit durch Quellen oder Schrumpfen der einen gequollenen Phase, partielle oder vollständige Lösung einer festen, oder Fällung aus einer flüssigen Phase wieder hergestellt. Dieser Zustand wird durch die Alkoholfixierung (Überführung gallertiger Gele in pektöse) mehr oder weniger festgehalten, wobei Konzentration des Alkohols oder alkohollösliche Salze durch Verhinderung der Alkoholfällung eine Rolle spielen können.

Die Tabellen für die einzelnen hier betrachteten morphologischen Elemente weisen bestimmte Gesetzmäßigkeiten auf, die untereinander manche Übereinstimmung haben. Die Zahl der untersuchten Elemente wurde der Einfachheit halber willkürlich eingeschränkt; Glia, Gefäßendotelien usw. vernachlässigt. Am ausführlichsten ist der Einfluß der Alkali- inkl. Mg-Salze untersucht worden, während für Erdalkali- und Schwermetallsalze noch genauere Untersuchungen notwendig sein werden.

Es ging hervor, daß sich die bei den histologischen Methoden sichtbar gemachten Elemente kolloidaler Natur Salzlösungen gegenüber ähnlich verhalten wie Eiweiß- oder Leimlösungen und daß

*) Vgl. hierzu Nernst: Theoretische Chemie 1895. II. Aufl. — Hofmeister: Die chemische Organisation der Zelle. 1901. — Höber: Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 1902. — Pauli: Allgemeine Physikochemie der Zellen und Gewebe. Ergebnisse der Physiologie II, 1 (1904).

die einzelnen kolloidalen Elemente verschiedenartig sind, was aus den Verschiedenheiten der einzelnen Reihen ersichtlich ist.

Die Umkehrung der Reihe bei den Zellfärbungen (Nisslschollen, Kerne und Kernkörperchen) könnte man eventuell als neues Argument für die Anwesenheit erheblicher Mengen von H-Ionen verwenden, wie dies ältere Autoren*) angegeben haben.

Vergleich der einzelnen Reihen:

Hofmeister (Wasseranziehungsvermögen):

Alkalisalze zwei- bis dreiwertiger Säuren > Acetate > Salze 1 basischer Säuren Cl > ClO_3; NO_3, Br.

Pauli (Eiweißfällung bei Alkalisalzen):

Fl > SO_4 > HPO_4 > Citrat > Tartrat > Acetat > Cl > NO_3 > Br > J > CNS und Mg > NH_4 > K > Na > Li.

Umkehrung der Reihe bei Zusatz von 0,03 n-HCl oder von Erdalkalisalz.

Höber (Beeinflussung des Ruhestroms im Muskel):

Tartrat > SO_4 > HPO_4 > Acetat > Cl > Br > J > NO_3 > CNS und Li < Na < Mg < Cs < NH_4 < Rb < K.

Erhaltung der Strangfasern (Tabelle I):

Fl > Tartrat > Citrat > SO_4 > Oxalat > Acetat > HPO_4 > Br > NO_3 > CNS > Cl > J und Li > Na > K > NH_4.

Intensität der Nisslfärbung (Tabelle X):

Acetat > Cl > NO_3 > CNS > Br > Tartrat > Fl > J > HPO_4 > Oxalat > SO_4 > Citrat und K > NH_4 > Na > Li.

Intensität der Kernfärbung (Tabelle XVIb):

Acetat > Fl > CNS > HPO_4 > J > NO_3 > Cl > Br > Tartrat > Oxalat > SO_4 > Citrat (?) und K > NH_4 > Na > Li.

Intensität der Färbung der Kernkörperchen (Tabelle XVIIb).

Acetat > Fl > J > CNS > NO_3 > HPO_4 > Cl > Br > Oxalat > SO_4 > Tartrat > Citrat (?) und K > Na > NH_4 > Li.

In allen Reihen erkennt man das allgemeine Gesetz: zweiwertige Anionen auf der einen, einwertige Anionen auf der anderen Seite; die einzelnen Details scheinen von der Natur der betreffenden Kolloide abhängig zu sein, so daß wir neben allge-

*) R. Gscheidlen, Pflügers Archiv 8, 171 bis 180. O. Langendorff, Neurologisches Centralblatt 24 (1885). J. Moleschott und A. Battistini, Arch. Italiennes 8, 90 bis 174.

meinen Regeln der Kolloidausflockung (wie additive Wirkung des Anions und Kations eines Salzes usw.) noch spezielle Beziehungen zwischen Kolloid und den einzelnen Ionen annehmen können, welche Beziehungen von der chemischen Natur des aufzuflockenden Körpers abhängen dürften.

Die Hauptergebnisse dieser Untersuchungen sind in folgender Tabelle enthalten, aus der auch die Konzentrationen der benutzten Lösungen ersichtlich sind. In Kolonne 2 sind die Molekulargewichte durch den Faktor 68,8 dividiert, welches Resultat die Konzentration der Lösung angibt, die einer 0,85 proz. Kochsalzlösung äquimolekular ist; die Zahl mit dem beistehenden Bruch (isotonischer Koeffizient auf NaCl bezogen) gibt die Zahl in der 3. Kolonne = isotonische Konzentration, in welcher die Salze angewendet wurden. 4. Kolonne = erhaltene Strangfasern. 5. 7. 8. Kolonne = Färbungsintensitäten der Nisslschollen, Kerne und Kernkörperchen. 6. Kolonne = Struktur der Nisslschollen. 9. Kolonne = Konservierung der Ganglienzellen. (Siehe Tabelle XXI auf Seite 572 und 573).

Von den speziellen Eigenschaften der untersuchten Elemente hat sich folgendes ergeben:

1. Der Unterschied, der in der primären Färbbarkeit zwischen Strangfasern des Rückenmarks einerseits und den intramedullären motorischen Fasern, motorischen und sensiblen Wurzeln, peripheren Nerven andererseits besteht, zeigt sich auch beim Verhalten dieser Gebilde gegen Salzlösungen. Während die einen von vielen Salzlösungen fast vollkommen zerstört werden, bleiben die anderen ganz oder fast ganz unverändert. Am empfindlichsten sind die Hinterstrangsfasern, wo doch die nahen sensiblen Wurzeln unverändert bleiben. Außer der Ausfällbarkeit der Strangfasern bei höheren Konzentrationen (NaCl, Na_2SO_4), der Irreversibilität der Alkoholfällung sowie der äußerst langsamen Autolyse sind besonders hervorzuheben: Die ganz verschiedene Resistenz von Rückenmarkssträngen und peripherem Nerv gegen physiologische Kochsalzlösung, die für eine morphologische und physiologische Verschiedenheit beider spricht. Dann die starke Schädigung, die eigenes Blut dem Rückenmarke zufügt, welche Tatsache manche pathologischen Vorgänge in ein neues Licht stellt.

2. Unter der Voraussetzung, daß die in den Nisslschollen sich färbende Substanz eine einheitliche ist, kann man außer den sich aus ihren Fällungsmöglichkeiten ergebenden Eigenschaften noch anführen: ihr Verschwinden in stark alkalischen, nicht aber

Tabelle XXI.

	1. Mole-kular-Gew.	2. MG/68,8	3. Isoton. Kon-zentrat.	4. Strang-fasern.	5. Nissl-schollen	6. Struk-tur	7. Kerne	8. Kernkör-perchen	9. Zellen
Al-oxalat[1])	186,2	2,71 × 3/6	1,35	15	7	sch	2	4	q
Al-tartrat	398,2	5,79 × 3/6	2,90	15	8	sch	7—8	8	
Al_2Fl_6[1]) *)	168,2	2,44 × 3/6	1,22	14	6	tz-sch	1—2	3—4	
NH_4Br	98,0	1,43 × 3/3	1,43	9,7	3—4	d	3	6—7	††
NH_4Cl[3])	53,5	0,78 × 3/3	0,78		6—7	tz	4	9	†
NH_4Fl	37,1	0,43 × 3/3	0,43	13,5	4—5	tz-sch	7—8	9	
NH_4J[2])	144,9	2,11 × 3/3	2,11	4,75	4	k-d	4	9	†††
$(NH_4)H_2PO_4$ *)	115,1	1,67 × 3/3	1,67	15	6	sch	2—3	7—8	
$(NH_4)_2HPO_4$	132,2	1,92 × 3/4	1,44	15	2	sch	4	8	
$(NH_4)_3PO_4$ + 3aq **)	203,2	2,95 × 3/5	1,77	10,75	0		3	8	
NH_4CNS	76,2	1,11 × 3/3	1,11	4,25	4—5	sch	6	5—6	
$(NH_4)_2SO_4$	132,2	1,92 × 3/4	1,43	14	0		2—3	7	n†
$BaCl_2$ + 2aq[3])	244,3	3,54 × 3/4	2,66	15	7		5—6	9	†
Pb-acetat + 3aq[3])	378,9	5,508		15	7—8	sch	4	7—8	n
$CdCl_2$ + 2aq[3])	219,3	3,19 × 3/4	2,39	15	6	sch	6	7	†n
$CaCl_2$[3])	110,9	1,61 × 3/4	1,21	15	8		8	.	n
KBr	119,1	1,73 × 3/3	1,73	9,27	5—6	tz-d	6	7	††
KCl	74,6	1,08 × 3/3	1,08	4,16	8	tz-sch	4	7—8	†n
KFl	58,2	0,84 × 3/3	0,84	15	4	tz-k	7—8	9	†n
KJ	166,0	2,41 × 3/3	2,41	4,1	4	k-d	6—7	9	††
KNO_3	101,2	1,47 × 3/3	1,47	7,7	6	k-d	7—8	8—9	†
$K_2(COO)_2$[3])	166,3	2,42 × 3/6	1,21	13,5	2	sch-d	5—6	8	†
$KCNS$	98,3	1,44 × 3/3	1,44	4,3	5—6	tz-sch	8	9	
KH_2PO_4 *)	136,2	1,98 × 3/3	1,98	4,42	8	sch	8	8	†n
K_2HPO_4	174,3	2,53 × 3/4	1,90	12	3	tz	8	8	n
K_3PO_4 **)	213,5	3,09 × 3/5	1,85	9,9	0		7—8	?	††
K_2SO_4	167,0	2,43 × 3/4	2,42	4	0		4	6	n
K-tartrat + 1/2 aq	235,3	3,42 × 3/4	2,57	13,3	14	sch	5—6	7	

[1]) In Wasser schlecht löslich, daher als Suspension benutzt.
[2]) Lösung leicht gelb verfärbt.
[3]) Ausschließlich Winterversuche.
*) Reagiert sauer. — **) Reagiert alkalisch.

Abkürzungen:

Nisslstruktur: sch = schollig. Zellen: n = normal.
tz = netzig. † = geschrumpft.
d = diffus. †† = stark geschrumpft.
k = körnig. ††† = sehr stark gechrumpft.
q = gequollen.

Zahl für die Strangfasern (Kolonne 4).
0 = ganz gelöst. — 15 = erhalten.

Tabelle XXI.

	1. Molekular-Gew.	2. MG/68,8	3. Isoton. Konzentrat.	4. Strangfasern	5. Nisslschollen	6. Struktur	7. Kerne	8. Kernkörperchen	9. Zellen
u-acetat + 1aq [3])	200	2,92		15	4—5	sch	6	4—5	†n
$uCl_2 + 2aq$ [3])	171,0	2,47		15	7—8	sch	8	9	n
$uSO_4 + 5aq$ [3])	250,0	2,88		14	8	sch	8	8—9	†n
iCl	42,5	0,62 × 3/3	0,62	11,7	3	tz	3—4	8—9	
iCNS	66,1	0,96 × 3/3	0,96	2,2	2—3	tz	4—5	5—6	
$i_2SO_4 + 1aq$	128,1	1,86 × 3/4	1,39	15	0—1		3	7	
i-tartrat	162,1	2,36 × 3/4	1,77	15	3	sch	4	6—7	
$gCl_2 + 6aq$	203,3	2,95 × 3/4	2,29	15	6	sch-k	6—7	9	n
gFl_2 [1])	60,4	0,88 × 3/4	0,66	3,5	6	tz-sch	2	6	
$g(NO_3)_2$	148,4	2,16 × 3/4	1,60	12,05	8	sch	8	9	
$g(COO)_2$ [2])	112,4	1,63 × 3/4	1,22	13,3	7—8	sch	2—3	7	
$g(CNS)_2 + 4aq$	214,6	3,12 × 3/4	3,00	14	8	sch	6—7	9	
$gSO_4 + 7aq$	246,4	3,58 × 3/2	5,37	13,2	7—8	sch	8	9	n
a-acetat **)	82,0	1,19 × 3/4	1,13	12	7—8	sch	7—8	9	n†
aBr + 4aq	175,0	2,54 × 3/3	2,54	8,33	4—5	k-d	4	7	n†
aCl	**58,5**	**0,85** × 3/3	**0,85**	4,4	5 6	tz-d	6	8	†
aFl	42,0	0,61 × 3/3	0,61	15	3—4		6	9	†n
aJ + 4aq	221,9	3,25 × 3/3	3,23	4,5	3	k-d	6—7	9	††
aNO_3 [3])	85,1	1,24 × 3/3	1,24	8,25	5—6	sch-tz	8	9	†
$a_2(COO)_2$ [3])	134,1	1,95 × 3/6	0,98	15	0—1	sch	4—5	7	†n
aCNS	82,15	1,19 × 3/3	1,19	6,95	5—6	k-tz	4—5	8	
$aH_2PO_4 + 4aq$ *)	197,7	2,22 × 3/3	2,22	15	6		6	8	
$a_2HPO_4 + 12aq$	358,1	5,21 × 3/4	3,90	10,75	1—2	sch	5	8	n
$a_3PO_4 + 12aq$ **)	380,2	5,53 × 3/5	3,32	13	0		4—5	9	q
a_2SO_4	142,2	2,07 × 3/5	1,55	14,2	0		3—4	8	n
a-tartrat + 2aq	230,1	3,35 × 3/4	2,48	15	4	sch	5—6	7—8	†
a-citrat **)	354	5,15 × 3/5	3,09	15	0		2	7	†n
$a_2CO_3 + 10aq$ **)	286,1	4,16		5	0		2	0	†
$iSO_4 + 7ag$ [3])	280,8	4,08		15	8	sch	8	9	n†

[1]) In Wasser schlecht löslich, daher als Suspension benutzt.
[2]) Lösung leicht gelb verfärbt.
[3]) Ausschließlich Winterversuche.

*) Reagiert sauer. — **) Reagiert alkalisch.

Abkürzungen:

Nisslstruktur: sch = schollig. tz = netzig. d = diffus. k = körnig.

Zellen: n = normal. † = geschrumpft. †† = stark geschrumpft. ††† = sehr stark geschrumpft. q = gequollen.

Zahl für die Strangfasern (Kolonne 4):
0 = ganz gelöst. — 15 = erhalten.

in schwach alkalischen Flüssigkeiten; die Löslichkeit der Alkoholfällung in Na_2SO_4, zum Teil auch in NaCl, die schwache Auflösung der $MgSO_4$-Fällung in Na_2SO_4, die relative Unzerstörbarkeit durch Autolyse und durch eigenes Blut, und die Schwankungen bei wechselnden Konzentrationen von NaCl und Na_2SO_4.

3. Da für histologische Zwecke das Gewebe so fixiert werden muß, daß Strukturänderungen möglichst vermieden werden, sind gute Fällungsmittel, wie die Schwermetallsalze, sehr zweckmäßige Fixationsmittel, da sie einerseits die Eiweißkörper prompt ausfällen, andererseits mit den Phosphatiden, die eine ziemliche Menge der Markscheidenmasse, vielleicht auch der anderen Gewebsteile ausmachen, in kaltem Alkohol unlösliche Verbindungen geben. Von den vielen untersuchten Lösungen, welche der physiologischen Kochsalzlösung isosmotisch sind, haben solche von Kupferchlorid, Bleiacetat, Natriumacetat, Kadmiumchlorid und Chlorcalcium, Kupfersulfat, Magnesiumchlorid sehr hübsche Bilder gegeben, sowohl mit Molybdänhämatoxylin- als auch mit Toluidinblaufärbung. Je nach dem gewünschten Effekt ist das Salz bald von dem einen, bald vom anderen Ende der Anionenreihe zu nehmen. —



Erklärung der Tafel.

Fig. 1. Längsschnitt durch Hunderückenmark nahe am Querschnitt des Blockes. Fixierung in Kadmiumchloridlösung. Strangfasern vollkommen erhalten.

Fig. 2. Längsschnitt 0,5 mm vom Querschnitt des Blockes. Fixierung in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 Proz.). Starke Auflösung der Strangfasern. Kugeln und Spindeln, leere Gliedmaschen, keine normale Faser im Gesichtsfeld. Fig. 1 und Fig. 2 mit Molybdänhämotoxylin gefärbt.

Fig. 3. Querschnitt. Vorderhornganglienzellen. Magnesiumchlorid. Färbungsintensität: Nisslschollen 8, Kerne 8, Kernkörper 8.

Fig. 4. Querschnitt. Vorderhornganglienzellen, Magnesiumoxalat, dunkle Nisslschollen (7 bis 8) und Kernkörperchen (7), aber helle Kerne (2).

Fig. 5. Querschnitt, Vorderhornzellen, Kaliumoxalat. Nisslschollen fast farblos (0,2), Kerne und Kernkörperchen dunkel (7 bzw. 8).

Präparate in 3, 4, 5 behandelt nach abgekürztem Nisslverfahren. — Alle Bilder 250fach vergrößert. Vgl. auch Text. Exposition stets 5 Min. bei Auerlicht und gleichlange Entwicklung.


Fig. 1.
Fig. 2.
Fig. 3.
Fig. 4.
Fig. 5.

Verlag von Friedrich Vieweg & Sohn, Braunschweig.

XXXVI.

Laktase und Zuckerausscheidung bei magendarmkranken Säuglingen.

Von Dr. Leo Langstein, Berlin, und Dr. Franz Steinitz, Breslau.

Aus der Berliner und Breslauer Kgl. Kinderklinik.

Ebenso wie bei Erwachsenen ist auch bei Säuglingen das Vorkommen kleiner Kohlehydratmengen im Urin unter physiologischen Verhältnissen von verschiedenen Autoren konstatiert worden. Während einzelne [Pollak*), Binet**), Mensi***)] eine physiologische Ausscheidung von Zucker und zwar von Dextrose annehmen, leugnen andere, wie Grosz†) und Neumann††), das Vorkommen von Zucker im Urin gesunder Säuglinge, da bei diesen die gebräuchlichen Zuckerreaktionen negativ ausfallen; vielmehr, da die Furfurolreaktion sehr häufig, die Muldersche Indigkarminreaktion stets ein positives Resultat ergibt, nehmen sie an, daß der normale Säuglingsurin Spuren von noch nicht näher charakterisierten Kohlehydraten bzw. andere reduzierende Substanzen, von denen einige, z. B. Harnsäure, Kreatinin und Glykuronsäure, konstante Harnbestandteile sind, enthält.

Hingegen ist die Ausscheidung von Harnzucker bei akut magendarmkranken Säuglingen sichergestellt. [v. Hofsten†††), Lesage†††), Grosz.]

Über die Natur des Urinzuckers bei magendarmkranken Säuglingen stellte zuerst Grosz Untersuchungen an. Er konnte zunächst nachweisen, daß die Zuckerausscheidung ausgesprochen

*) Jahrb. f. Kinderheilkunde 12, 176.

**) Binet, cit. nach Czerny und Keller, d. Kindes Ernährung usw. Heft 2, S. 200.

***) Mensi, das.

†) Jahrb. f. Kinderheilkunde 34. 81.

††) Arch. f. Kinderheilkunde 12.

†††) cit. nach Grosz.

alimentär erfolgte, also bei Teediät verschwand, um sofort wieder bei Zuführung der Nahrung (in allen Fällen Muttermilch) einzusetzen. In zwei Fällen konnte er konstatieren, daß der Zucker rechtsdrehend und nicht gärungsfähig war. Es handelte sich also keinesfalls um Glykose. Grosz nahm an, daß Milchzucker oder ein Spaltungsprodukt desselben vorlag.

Über die Ursache, weshalb die Laktose bei magendarmkranken Kindern der Assimilation entgeht und zur Ausscheidung durch den Urin gelangt, machte sich Grosz im allgemeinen richtige Vorstellungen. Es war bereits damals bekannt, daß Milchzucker nicht als solcher, sondern erst nach Inversion zu Monosacchariden im Organismus Verwendung finden könne. Escherich*) hatte dieser Annahme durch die Meinung Ausdruck gegeben, daß der Milchzucker, wenn er nicht unverändert im Harne ausgeschieden werden solle, vor der Resorption verdaut, d. h. in eine gärungsfähige Zuckerart, wie er meint, in Galaktose umgewandelt werden müsse, und Dastre**) hatte bereits ein diese Umwandlung bewerkstelligendes Ferment angenommen. Auf diese Autoren gestützt vermutete Grosz, daß in seinen Fällen von Zuckerauscheidung das milchzuckerspaltende Ferment entweder gefehlt habe oder infolge von Bakterienwirkung teilweise oder ganz abgeschwächt gewesen sei, sodaß ungespaltener Milchzucker resorbiert und als solcher durch den Urin ausgeschieden wurde. Spätere Untersucher wiesen nun tatsächlich ein milchzuckerspaltendes Ferment in der Dünndarmschleimhaut nach. Röhmann und Lappe***) sowie unabhängig von ihnen Pantz und Vogel†) konnten Milchzuckerspaltung durch Digestion mit Dünndarmschleimhaut, erstere mit der vom Kalb und Hund, letztere mit der eines neugeborenen Kindes erzielen. Fischer und Niebel††), die sich gleichfalls mit diesem Ferment beschäftigten, nannten es „Laktase".

Orban†††), der experimentelle Untersuchungen über Laktase anstellte, fand, daß die Bildung des Fermentes von dem Zustande der Darmschleimhaut abhängig sei. Während er Laktase beim gesunden Hunde im Dünndarm stets nachwies, vermißte er sie in der durch Podophyllotoxin schwer affizierten Dünndarmschleim-

*) Jahrb. f. Kinderheilk. **27**, 100.
) Dastre, Compt. rend. **96, 1883.
***) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **28**, 2506.
†) Zeitschr. f. Biol. **32**, 303.
††) Sitzungsber. d. kgl. preuß. Akademie d. Wissenschaften 1896.
†††) Prager med. Wochenschr. **24** (1899).

haut. Ebenso verschwand das Ferment, das Orban bei den meisten gesunden Säuglingen im Stuhle nachweisen konnte, aus den Entleerungen schwer magendarmkranker Kinder. Er schloß daraus, daß es auf der Höhe der Darmerkrankung zu keiner Laktasebildung komme, und daß der Milchzucker dann infolge Ausbleibens der Inversion längere Zeit als unter normalen Verhältnissen im Darme verweile und durch seine Zersetzung einer abnormen Gärung Vorschub leiste.

Soweit reichen unsere Kenntnisse über die Laktase und Zuckerausscheidung bei magendarmkranken Säuglingen. Es lag nun nahe zu untersuchen, in welchem Zusammenhange die Zuckerausscheidung mit der Bildung des milchzuckerspaltenden Fermentes stehe, und ob tatsächlich die Laktosurie abhängig sei vom Nichtvorhandensein oder der mangelhaften Wirkung der Laktase im Dünndarm. Indem wir uns dieser Aufgabe zuwandten, mußten wir einmal feststellen, ob der von magendarmkranken Kindern im Urin ausgeschiedene Zucker tatsächlich Milchzucker ist, und zweitens, ob für das Zustandekommen einer Laktosurie ein Verschwinden der Laktase im Darme, wie es Orban beobachtet hatte, verantwortlich gemacht werden könne.

Bevor wir unsere Untersuchungsergebnisse, die an dem Material der Berliner und Breslauer Kgl. Kinderklinik gewonnen sind, mitteilen, müssen wir kurz auf die Technik unserer Versuche eingehen.

Der Nachweis von Laktase wurde von uns genau in der von Orban angegebenen Weise ausgeführt.

Der Stuhl wurde möglichst bald nach seiner Entleerung mit physiologischer Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser emulgiert und mit 6 g Milchzucker auf 100 ccm aufgefüllt. In den meisten Fällen wurden dann 50 ccm nativ und 50 ccm nach kurzem Aufkochen mit einem Überschusse von Chloroform im Thermostaten digeriert. Nach 10 bis höchstens 24 Stunden wurde die Emulsion mit Natronlauge und Bleiacetat ausgefällt und in dem Filtrate das überschüssige Blei mit Natriumsulfat beseitigt. Die klare Lösung wurde mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat versetzt, filtriert und 2 Stunden im kochenden Wasserbade gehalten. Das Vorhandensein von Laktasewirkung zeigte sich dadurch, daß sich die wasserunlöslichen Dextrosazon- und Galaktosazonkristalle noch während des Siedens am Boden der Eprouvette ansammelten. Dieselben konnten auch mikroskopisch identifiziert werden. Meist wurde daneben die Gärungsprobe angestellt, die stets gleichsinnig mit der Osazonprobe ausfiel. Die vorher aufgekochten Proben zeigten nie Gärung; auch konnte durch die Osazonprobe nie eine Spaltung der Laktose bei ihnen nachgewiesen werden.

Die Urine wurden entweder in einzelnen Portionen oder, wenn möglich, nach Aufsammeln der gesamten Tagesmenge, die oft allerdings abnorm gering war, verarbeitet. Wir konnten uns zum Nachweise von

Zucker nun keineswegs mit dem positiven Ausfalle der Reduktionsprobe begnügen. Sowohl die Trommersche wie die Nylandersche Probe fallen, wie für Säuglinge Neumann und Grosz zeigten, sehr häufig positiv aus, und zwar auch in Fällen, in denen Zucker mit Sicherheit auszuschließen ist.

Überdies weist erst neuerdings Pflüger*) auf die Unsicherheit der Trommerschen und der Wismuthprobe hin. Auch in der entgegengesetzten Richtung läßt die Kupferoxydprobe bei Säuglingen nicht selten im Stiche. Grade die Urine, die für unsere Untersuchungen in Frage kamen, waren infolge der vorhandenen Acidose oft außerordentlich ammoniakreich, und ein Ausfallen des reduzierten Kupferoxydules erfolgte oft erst nach längerem Kochen, nachdem ein Teil des Ammoniaks durch die zugesetzte Natronlauge vertrieben war. Auch die Gärungsprobe konnte uns nicht von praktischer Bedeutung sein, wenn es darauf ankam, das Vorhandensein von Zucker festzustellen. Denn da es sich, wie zu erwarten war, um Laktose oder ein Spaltungsprodukt derselben handelte, so bewies der negative Ausfall der Gärung nichts. Hingegen war sie, wenn erst das Vorhandensein von Zucker sichergestellt war, von Wichtigkeit, da sie die Glykose oder Fruktose ausschloß.

Wirklich eindeutig und von entscheidendem Einfluß darauf, ob ein Urin als zuckerhaltig anzusehen war, schien uns die Osazonprobe zu sein. Denn erstens ist sie zuverlässig und gestattet noch sehr geringe Zuckermengen nachzuweisen. Dann aber führt sie uns einen Schritt weiter in der Erkenntnis, um was für eine Zuckerart es sich handelt. Mit Sicherheit gestattet sie uns wenigstens die Entscheidung, ob ein Mono- oder Disaccharid vorliegt. Bekanntlich sind die Osazone der Maltose und Laktose in heißem Wasser relativ leicht löslich, während die Osazone aller Monosaccharide selbst in siedendem Wasser nur spurenweise in Lösung gehen. Berücksichtigt man ferner, daß die Osazone der Monosen einen Stickstoffgehalt von 15,64 Proz., die der Biosen einen solchen von 10,8 Proz. aufweisen, und daß die Schmelzpunkte derselben zwar nicht große, aber doch erkennbare Differenzen zeigen, so sind damit weitere Handhaben zum Identitätsnachweise eines Zuckers gegeben. Schließlich bedienten wir uns zuweilen des Nachweises von Schleimsäure, die nur bei Oxydation von Galaktose (bzw. Laktose), nicht aber von Glykose darstellbar ist.

Da fast alle Untersuchungen, über die weiterhin berichtet werden soll, während ausschließlicher oder vorwiegender Ernährung mit Frauenmilch angestellt sind, die ja doch nur ein Kohlehydrat, die Laktose enthält, so konnte es sich zumeist nur um Milchzucker oder seine Spaltungsprodukte, die Galaktose oder Dextrose handeln.

Wenn wir die Eigenschaften, die zur Identifizierung dieser Zuckerarten dienen konnten, kurz zusammenfassen, so sind es die folgenden:

1. Laktose. Sie reduziert, gärt aber nicht mit Bierhefe. Bei der Oxydation ergibt sie Schleimsäure. Ihr Osazon bildet kuglige Aggregate, die sich in heißem Wasser leicht lösen. Der Schmelzpunkt des Laktosazons beträgt etwa 200°, sein N-Gehalt 10,8 Proz.

2. Galaktose. Sie reduziert. Mit Bierhefe gärt sie gleichfalls nicht**).

*) Pflüger, Schöndorff und Wenzel, Pflügers Archiv **105**, 121.

) Hammarsten (Lehrb. f. physiol. Chemie) sagt zwar, daß Galaktose langsam mit Bierhefe vergoren werden könne. Luzzatto (Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie **52, 107) bestreitet das jedoch. Wir können

Sie ergibt bei Oxydation mit Salpetersäure Schleimsäure. Ihr Osazon bildet lange büschelförmig angeordnete Nadeln, die in kochendem Wasser fast unlöslich sind. Der N-Gehalt des Galaktosazons beträgt 15,64 Proz.

3. Die Dextrose unterscheidet sich von der Galaktose dadurch, daß sie leicht mit Hefe gärt. Sie läßt sich nicht zu Schleimsäure oxydieren.

Bezüglich der Gewinnung der Osazone bemerken wir, daß wir den Urin in einem Teil der Fälle direkt mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat kochten. In dem anderen Teile, und zwar besonders dann, wenn es sich um zuckerarme Urine handelte, fällten wir sie nach dem Vorgange von Commandeur und Porcher*) mit dem Patein-Dufauschen Reagens**), einer Quecksilbernitratlösung, die Harnstoff, Kreatininbasen, Eiweiß usw. entfernt, aber Zucker quantitativ in dem farblosen Urinfiltrat beläßt. Dasselbe wird neutralisiert, das überschüssige Quecksilber mit H_2S entfernt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt. Die so erhaltene Lösung diente zur Herstellung der Osazone. Nachdem sie während 1 bis $1^1/_2$ Stunden mit essigsaurem Phenylhydrazin erhitzt war, wurde sie abgekühlt, das ausfallende Osazon auf einem Filterchen gesammelt, und dann das Laktosazon durch Waschen mit kochendem Wasser in Lösung gebracht. Das zurückbleibende Monosazon wurde auf dem Filter lange mit kochendem Wasser ausgewaschen und aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Schließlich wurde es auf einem Filterchen abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Laktosazon, das sich aus der erkaltenden Lösung wieder abschied (und zwar, wie Commandeur und Porcher richtig bemerken, durchaus nicht typisch, sondern polymorph, zuweilen sogar in ganz kleinen Schollen) wurde noch 1 bis 2mal aus heißem Wasser und schließlich aus dünnem Alkohol oder Acetonwasser umkristallisiert, abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Zur Darstellung von Schleimsäure wurde der (eventl. nach Patein-Dufau ausgefällte) Urin mit essigsaurem Blei und Ammoniak behandelt, der gewaschene Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, filtriert und nach Entfernung des überschüssigen H_2S 3mal mit Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,2 abgedampft. Die sich ausscheidenden, in heißem Wasser schwer löslichen Kristalle vom charakteristischen Aussehen der Schleimsäure werden eventl. noch getrocknet, mit Ammoniak im Überschusse abgedampft und der Rückstand in einer Eprouvette trocken erhitzt. Ein mit Salzsäure benetzter Fichtenspan zeigte dann durch Rotwerden die Pyrrolreaktion.

---

ihm völlig beistimmen. Käufliche Galaktose, die wir dadurch von Dextroseresten befreiten, daß wir ihre Lösung 24 Stunden mit Hefe im Thermostaten stehen ließen, und die wir nach Filtration eindampfen und auskristallisieren ließen, verhielt sich Bierhefe gegenüber durchaus negativ. Sie gor in 24 Stunden auch nicht in Spuren.

*) Arch. gén. de méd. 1904, Nr. 36.

**) 220 g rotes Quecksilberoxyd werden in einer Porzellanschale mit 160 ccm Salpetersäure (spez. Gewicht 1,39) und nach 5 bis 6 Min. mit 160 ccm Wasser versetzt. Unter Aufkochen wird das Oxyd völlig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung werden 40 ccm 10proz. Natronlauge in dünnem Strahle unter Umrühren hinzugefügt, das Ganze auf 1 Liter aufgefüllt und filtriert. In dunkler Flasche aufgehoben ist das Reagens dauernd haltbar. Zur völligen Ausfällung genügt 1 Teil Reagens auf 4 Teile Urin.

a) Laktase.

Die Untersuchungen von Orban erstrecken sich auf 30 Säuglinge.

Bei 25 einmal untersuchten Kindern war das milchzuckerspaltende Ferment 21 mal nachzuweisen, bei fortlaufend während 4 bis 8 Tagen untersuchten Kindern fand es Orban 1 mal täglich, 1 mal überhaupt nicht und 3 mal nicht durchwegs an allen Untersuchungstagen. Ein Einfluß der Bakterienflora, die er durch nach Gram-Weigert gefärbte Präparate kontrollierte, auf die Laktase schien nicht zu bestehen. Hingegen war die Wirkung der Laktase von dem Krankheitszustand der Kinder abhängig. Bei Kindern in gutem Zustande war sie vorhanden, sie verschwand, wenn die Zahl der Stühle stieg, und das Allgemeinbefinden der Kinder sich verschlechterte. Dieses Verhalten war aber durchaus nicht regelmäßig. Auch normal aussehende Faeces ließen in wenigen Fällen die Laktase vermissen, und andererseits ergab die Prüfung der Faeces bei einem schwer kranken Kinde (Fall IV) das Vorhandensein von Laktase während des Collapses und das Verschwinden des Fermentes, als die Stühle wieder normale Beschaffenheit angenommen hatten.

Unsere eigenen Untersuchungen, die sich mit 44 Einzeluntersuchungen auf 38 Säuglinge beziehen, weichen in ihren Resultaten von denen Orbans nicht unerheblich ab. Es gelang uns nämlich Laktase in jedem Falle nachzuweisen*). Dabei umfaßte unser Material gesunde Kinder, Kinder mit leichten akuten, chronischen und schließlich solche mit den schwersten toxischen und infektiösen Magendarmerkrankungen (akut. Enterokatarrh der Widerhoferschen Einteilung). Das Alter der Kinder war gleichgiltig; auch ganz junge Säuglinge hatten, selbst wenn sie schwer krank waren, Laktase in ihrem Stuhle. Stühle, die dünnflüssig waren und viel Schleim enthielten, zeigten im allgemeinen eine geringere Laktasereaktion als breiige oder voluminöse. Allerdings waren wir ja bezüglich der Quantität des Fermentes auf grobe Schätzungen angewiesen.

Den Einfluß der Nahrung auf die Laktase können wir aus unserem Material nicht mit Sicherheit erschließen. Denn die über-

---

*) Nur in einem Falle (Nr. 7 der folgenden Tabelle) fiel am 1. Tage der Untersuchung die Laktasereaktion negativ aus. Der Stuhl hatte aber, bevor er zur Verarbeitung gelangte, über 24 Stunden auf Gummipapier gelegen. Als am folgenden Tage noch einmal untersucht wurde, ergab sich das Vorhandensein von Laktase trotz gleichzeitig bestehender Laktosurie.

wiegende Mehrzahl unserer Kinder war natürlich genährt. Aber auch die künstlich ernährten Kinder hatten Laktase in ihren Entleerungen, sodaß wir mit Sicherheit die Vermutung von der Hand weisen können, die Hauptquelle des Fermentes sei die Frauenmilch, wie es für das diastatische Ferment des Stuhles sehr wahrscheinlich ist.

Die Frage, warum wir Laktase in Säuglingsstühlen nie vermißt haben, während Orban sie in 5 von 30 Fällen nicht finden konnte, ist nicht leicht zu beantworten. Unsere Untersuchungstechnik schloß sich genau an die Orbans an; auch war das Material an Kindern nicht verschieden, abgesehen vielleicht davon, daß die Säuglinge, die Orban untersuchte, im großen Ganzen jünger als unsere waren. Da wir unmöglich annehmen können, daß Orban die Stühle nicht frisch untersucht hat und dadurch zu ungünstigeren Resultaten gekommen ist, so bleibt uns nur zur Erklärung der Differenzen die Tatsache übrig, daß seine Proben nur 12 bis 14 Stunden, unsere meistens etwas länger, bis höchstens 24 Stunden der Brutwärme ausgesetzt wurden. Es wäre demnach möglich, daß kleine Mengen von Laktase auf diese Weise seiner Beobachtung entgangen sind.

Wie dem auch sei, jedenfalls berechtigen uns unsere Resultate zu dem Schlusse, daß selbst bei schwer kranken Säuglingen die Laktasebildung im Darme nicht sistiert. Dieses Verhalten scheint uns das natürliche zu sein und mußte a priori erwartet werden. Auch das Labferment, das Pepsin und alle übrigen Verdauungsfermente werden durch Ernährungsstörungen nicht zum Versiegen gebracht, sondern werden auch bei den schwerst kranken Säuglingen sezerniert.

b) Zuckerausscheidung.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Zuckerausscheidung bei magendarmkranken Säuglingen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle.

Fall	Unter-such.-Zeit	Alter	Krankheitsverlauf	Stuhl- Aus-sehen	Stuhl- Lak-tase	Urinbefund
1. Chr.	26. XI.	$3^1/_2$ Woch.	Zuerst Frauenmilch, dann $^1/_3$ Milch u. schließl. 8 Tage nur Hafergries. Bei letzterer Ernährung mit Brechen u. Durchfall erkrankt. Verfallenes Kind; beginnendes Sclerem. Vom 28. XI. ab Frauenmilch.	5 mal täglich dünn.	++	Anurie
	28. XI.					Reduktion; wenig wasserlösl. Osazon.
	29. XI.			3 mal tgl. gelb sauer, dünn.	++	wasserlösl. Osazon; aus Aceton umkristallis.: Laktosazon.

Fall	Unter-such.-Zeit	Alter	Krankheitsverlauf	Stuhl- Aus-sehen	Lak-tase	Urinbefund
2. B.	15. XII.	7 1/2 Mon.	Bei künstl. Ernährung erkrankt. Wurde zuerst mit Frauenmilch, dann mit Butter- bzw. Magermilch ernährt. Bei dieser Ernährung v. neuem erkrankt. Vom 14. XII. ab wieder Frauenmilch, da akuter Verfall eintrat. Körpergewicht am 14. XII. 4600 g,			Urin reduziert erst nach Kochen. (Starker NH_3geruch). Wasserlösl. Osazon: Laktosazon.
	17. XII.		am 16. XII. 4120 g.	1 mal täglich grau-gelb, schleimig	++	
3. G.	29. XII.	7 Woch.	Bei 1/4 Milch an Durchfall und Erbrechen erkrankt. Gewicht 3050 g. Pemphigusblasen allenthalben auf dem Rumpfe. Herz schlecht. Trotz Ernährung mit Frauenmilch allmählicher Verfall. Exitus am 2. I.	1 mal, gelb, homog.	++	Reduktion vor dem Kochen. (Trommer.) Osazon, aus Acetonwasser umkristallis., typ. für Laktosazon. Schmelzpunkt 198–200°.
4. J.	15. I.	3 Mon.	Bei künstlicher Ernährung (1/3 Milch) mit Durchfällen erkrankt. Vom 7. I. ab Frauenmilch. Schlechtes Aussehen; Soor. R. H. U. Knisterrasseln.			Reduktion erst nach d. Kochen (Trommer.) Nylander +. Orcinprobe –. Geringe Mengen von Laktosazon dargestellt.
	17. I.		Herzaktion schlechter. Am 20. I. exitus.	4 mal, stark schleimig	++	Reduktion (Trommer) v. dem Kochen.
5. Gertr. F.	7.–8. II. 05.	2 Mon.	Von Geburt an Ernährgs.-störungen. Mageres atrophisches Kind. Hautfarbe leidlich; Herztöne leise. Gew. 2540 g. Vom 7. II. abends ab Frauenmilch.	2 mal Frauenmilchstuhl	+	Urin durch Katheterismus entleert. Trommer +. Nylander +. Wasserlösl. Osazon: nach 2 maligem Umkristallis. typ. f. Laktosazon.
6. Spr.	16. VIII. 04.	3 Mon.	Schwere akute Magendarmerkrankg. (ak. Enterokatarrh) Gew. 3510. Ernährung: Frauenmilch. Exitus am 18. VIII.	3 mal wässerig, sauer.	+	Urin gärt nicht. Osazon wasserlöslich, typ. für Laktose.

Fall	Unter-such.-Zeit	Alter	Krankheitsverlauf	Stuhl- Aus-sehen	Stuhl- Lak-tase	Urinbefund
7. P.		$3^1/_2$ Mon.	Mit Erbrechen und Durchfällen erkrankt. Schwerer Collaps. Soor. Gew. 3910 g. 6. VIII. Teediät, 8. VIII. 100 g Frauenmilch.			
	9. VIII.			schleimig, dünn, sauer.	— (?)	130 ccm Urin. Trommer +. Nylander +. Keine Gährung, wasserlösliches Osazon (0,7 g), N-Gehalt = 12,1 Proz.
	10. VIII.		Gewicht 3630 g. 480 g Frauenmilch.	2 mal dünn.	++	Wasserlösl. Osazon dargestellt.
	12. VIII.		T: 39°. Ernährung: 300 g Frauenmilch. 90 g $2^1/_2$ proz. Rademanns Mehlsuppe.		+	Laktosazon.
8. Gertr. M.	13. VIII.	$3^1/_2$ Mon.	Am 17. VI. zum ersten Male unter schweren Magendarmerscheingn. erkrankt. Am 13. VIII. Rezidiv. Kollabiertes Aussehen. T: 40°. Teediät. Gewicht 4640 g.	14 mal dünn, sauer.	+	Urin reduziert. Kein Osazon.
	15. VIII.		280 g $2^1/_2$ proz. Rademannsche Mehlsuppe.			Kein Osazon
	16. VIII.		50 g Frauenmilch. 50 g entfettete Frauenmilch.	4 mal dünn.	+	Laktosazon.
	17. VIII.		160 g Frauenmilch. 150 g Rademann.	4 mal	+	Trommer +. Nylander +. Kein Osazon.
	19. VIII.		Exitus.			
9. K.	16. VIII.	24 Tage	Schwere Ernährungsstörung. Nephritis. Gewicht 2260 g. Fieberfrei. 400 g Frauenmilch.	4 mal dünn schleimig.	+	Urin enth. Albumen, Cylind., Reduktion +. Gärt nicht. 2 Osazone. Wasserlösl. (a), wasserunl. (b), a = 12,8 % N. b = 14,43 % N. Schleimsäurenachweis positiv.
	18. VIII.		100 g Frauenmilch.	2 mal	+	Laktosazon.
	22. VIII.		Exitus.			
10. B.	6. IX.	8 Woch.	Bei Brustnahrung mit Erbrechen und starken Durchfällen erkrankt. Cyanose, fliegender Puls.	6 mal spritz. dünnflüssig.	+	Urin enth. nach Fehling $1^1/_2$ % Zucker, gärt nicht; Schleimsäurenachw. +. Galaktosazon mit Spuren Laktosazon.
	8. IX.		Bedeutende Besserung nach Teediät. Ausgang in Heilung.	2 mal flüssig.	+	

Fall	Unter-such.-Zeit	Alter	Krankheitsverlauf	Stuhl- Aus-sehen	Lak-tase	Urinbefund
11. A.	22. VII.	8 Mon.	Mit roher Vollmilch ernährt (Viktoriapark), mit spritzenden Stühlen u. Collaps schwer erkrankt.	5 mal flüssig.	+	Redukt. stark; Urin gärt nicht. Schleimsäurenachw. + 2 Osazone.
	27. VII.		Besserung; erhält täglich 100–150 g Frauenmilch.	2 mal breiig.	+	2 Osazone, wasserlösl. u. wasserunlösl.
12. M.	2. IX.	7 Woch.	Schwerster Enterokatarrh. Collaps. 100 g entfett. Frauenmilch. Exitus am 3. IX.	5 mal spritz. flüssig	+	2 Osazone, wasserlösl. u. wasserunlösl.
13.*) D.		6 Woch.	Bei künstl. Ernährung m. Erbrechen und Durchfall erkrankt. Gewicht 3200 g. Blasses, schlaffes Kind. Frauenmilch (300 g pro Tag.)	saure spritz. Stühle		2 Osazone. Wasserlösl. (a), wasserunl. (b). a = 11,27 % N. b = 15,92 % N. Schleimsäurenachw. positiv.
14. Sch.	18.-20. IX.		Bei künstlich. Ernährung schwer erkrankt m. Brechen und Durchfall. Eingefallene Augen, graue Farben, schlechte Herzaktion.			Urin von fast 2 Tagen (etwa 100 ccm) ergibt starke Redukt., gärt nicht Rechtsdrehung (etwa 1/2 Proz. auf Traubenzucker berechnet); wasserlösl. Osazon, typ. für Laktosazon.
	20. IX.			2 mal zähe, gelbgrün	++	
	21. IX.		Nachm. exitus.			

Wir haben in 14 Fällen und zwar im ganzen 17mal im Urin schwer magendarmkranker Säuglinge Zucker nachweisen können. In fast sämtlichen Fällen (16) handelte es sich, wie die Osazonuntersuchung mit Sicherheit zeigte, um Ausscheidung von Milchzucker. In diesen Fällen ließ sich ein Osazon darstellen, das sich in heißem Wasser löste, in kaltem Wasser unlöslich war und bei Umkristallisieren in für Laktose typischen kugligen, mit spitzen Nadeln besetzten Aggregaten ausfiel. Die Schmelzpunktsbestimmung in 1 Falle (Nr. 3) ergab den für Laktosazon bekannten Wert (200°). In den Fällen, in denen die Gärungsprobe angestellt wurde (Nr. 6, 7, 9, 10, 11, 14), fiel dieselbe negativ aus. In 4 Fällen (Nr. 9, 10, 11, 13) wurde der Nachweis erbracht, daß Oxydation des Urinzuckers Schleimsäure lieferte. Endlich wurde

*) Diesen Urin verdanken wir Herrn Dr. Engel, Assistenten am Dresdener Säuglingsheim, der ihn uns mit freundlicher Erlaubnis des Herrn Prof. Schloßmann überließ. Beiden Herren sagen wir dafür unseren ergebensten Dank.

in 3 Fällen eine Stickstoffbestimmung des wasserlöslichen Osazons ausgeführt. Dieselbe ergab folgende Werte (nach Dumas):

Fall Nr. 7	12,1	Proz. N
„ „ 9	12,3	„ „
„ „ 13	11,27	„ „

Der berechnete Wert für Laktosazon ($C_{24}H_{32}N_4O_9$) beträgt 10,8 Proz.

Es zeigte sich also, daß das Osazon trotz zweimaligen Umkristallisierens nicht völlig rein darzustellen war.

In 5 Fällen (Nr. 9, 10, 11, 12, 13) wurde daneben noch ein zweiter Zucker ausgeschieden. Derselbe gor gleichfalls nicht und lieferte ein wasserunlösliches, in langen Nadeln kristallisierendes Osazon. Es konnte wegen des typischen Verhaltens des letzteren und seiner Unfähigkeit mit Bierhefe zu gären, nur Galaktose sein. Der Identitätsbeweis wurde durch die N-Bestimmung des Osazons mit Sicherheit erbracht:

Nr. 9	14,43	Proz. N
„ 13	15,92	„ „

(berechnet für Galaktosazon ($C_{18}H_{22}N_4O_4$) 15,64 Proz.).

In einem Falle (Nr. 10) wurde Galaktose allein, neben geringen Spuren von Laktose gefunden.

Es kann demnach keinem Zweifel unterliegen, daß schwer magendarmkranke Säuglinge in ihrem Urin Milchzucker und das eine seiner Spaltungsprodukte, Galaktose*), ausscheiden, und daß diese Ausscheidung unabhängig von dem Nachweise von Laktase im Stuhle erfolgt.

Die Galaktosurie, die übrigens bisher beim Menschen unseres Wissens noch nie beschrieben ist, bedarf keiner weiteren Erklärung. Ihr Auftreten steht nicht im Widerspruche mit einer Laktasewirkung im Darme, setzt im Gegenteile sogar eine solche voraus. Sie beweist nur, daß von den beiden Spaltungsprodukten des Milchzuckers das eine, die Glykose, leicht im intermediären Stoffwechsel verbrannt wird,

*) Das Auftreten von Galaktose im Harne könnte vielleicht zur Deutung Veranlassung geben, daß es sich um Laktosurie handelt, und daß der Milchzucker außerhalb des Körpers durch Laktase gespalten würde, die vom intermediären Stoffwechsel aus mit in den Urin überginge. Aber abgesehen davon, daß Laktase im Gegensatze zur Diastase und Maltase nicht jenseits des Darmes anzutreffen ist und auch von uns bei wiederholten Versuchen niemals im Urin gefunden wurde, müßte auch, wenn es sich um nachträgliche Spaltung von Laktose handelte, neben Galaktose auch Glykose vorhanden sein, der Urin gären, was aber nie der Fall war.

während das andere, die Galaktose, der Assimilation wegen ihrer schweren Oxydierbarkeit entgeht. Bereits Hofmeister*) hatte darauf hingewiesen, daß die Assimilationsgrenze der verschiedenen Monosaccharide nicht gleich sei, und daß Galaktose viel leichter im Urin zur Ausscheidung gelange als Dextrose und Lävulose. Diese Tatsache erfuhr ihre Bestätigung durch Versuche von Luzzatto**) an Hunden. Fütterte dieser Autor Hunde (Körpergewicht 9 bis 10 kg) mit Milchzucker (30 g), so schieden sie in ihrem Urin Zucker aus, der weder im nativen Urin noch nach Inversion vergoren werden konnte. Der Schmelzpunkt seines Osazons betrug 192 bis 193°, dessen N-Gehalt 15,59 Proz.; es handelte sich also zweifellos um Galaktose.

Ganz analoge Verhältnisse liegen bei schwer magendarmkranken Säuglingen vor. Ein Teil des aufgenommenen Milchzuckers wird nach Inversion zu Galaktose und Dextrose resorbiert, die letztere verbrannt und die erstere wieder mit dem Urin aus dem Kreislauf entfernt.

Viel schwerer als die Galaktosurie ist die Laktosurie zu deuten. Da in allen unseren Versuchen Laktase im Darme gebildet wurde, und nach unseren Schätzungen die Quantitäten des Fermentes nicht wesentlich von einander differierten, so scheint der Befund von Laktose im Urin völlig rätselhaft zu sein.

Man könnte sich vorstellen, daß Laktase im Darme abgesondert wird, aber deswegen nicht wirkt, weil die Reaktion, die zur Enzymwirkung gehört, im Darme der magendarmkranken Kinder nicht die richtige ist. So wirkt Ptyalin nur in alkalischer, Pepsin nur in saurer Lösung. Könnte nicht vielleicht Laktase ebenfalls empfindlich gegen Änderungen der Reaktion sein und in dem stark sauren Dünndarminhalt der erkrankten Säuglinge ihre Wirksamkeit einbüßen?

Nach Bierry und Salazar***) wird die Laktasewirkung durch einen Salz- oder Essigsäuregehalt von 0,02 bis 0,04 auf 1000 gesteigert, durch einen solchen von 0,5 bis 1,0 auf 1000 aber völlig aufgehoben.

Bokorny†) hingegen fand die Laktase gegen Säuren, wie Milchsäure, in weiten Grenzen unempfindlich und selbst in einer 1,6proz. Milchsäurelösung noch wirksam. Wir selbst möchten nach unseren eigenen Erfahrungen der Meinung des letzteren

*) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 25, 240.

**) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 52, 107.

***) Compt. rend. de la soc. de biol. 1904, S. 181.

†) Milchzeitung 32, ref. nach Maly, Jahresber. 33, 1003.

beitreten. Da uns bei unseren Untersuchungen Stühle von verschiedensten Aussehen und Reaktionen begegnet sind und die stark sauren diarrhoischen Entleerungen ebenso wie die alkalischen festen Stühle nach Vollmilchernährung ein wirksames milchzuckerspaltendes Ferment enthielten, so möchten wir der Art der Reaktion keine große Bedeutung beimessen.

Zur Erklärung des Zustandekommens einer Laktosurie muß fernerhin in Erwägung gezogen werden, daß Laktase nur in den obersten Darmabschnitten, nach Pantz und Vogel nur im Jejunum gebildet wird. Nun ist in den meisten Fällen, in denen es zur Laktosurie kommt, die Darmperistaltik stark beschleunigt. Es könnte also der Milchzucker der Frauenmilch, bevor er gespalten ist, in tiefere Darmabschnitte transportiert werden und dort als solcher zur Resorption gelangen. Auch diese Annahme hat wenig für sich. Denn da die Laktase mit in den Darminhalt übergeht und sogar in den Entleerungen nachweisbar ist, so ist auch die Nahrung selbst bei raschester Passage durch den Darm zu jeder Zeit der Fermentwirkung ausgesetzt.

Eine ausreichende Erklärung für das Zustandekommen einer Laktosurie vermögen wir demnach nicht zu geben. Mag nun ein Mißverhältnis zwischen Laktasewirkung und Menge der im Darm zur Resorption gelangenden Laktose vorhanden sein, oder mag Milchzucker, ehe er einer quantitativen Aufspaltung unterlegen ist, durch die bei magendarmkranken Säuglingen funktionell oder anatomisch geschädigte Darmwand hindurchtreten, jedenfalls erreicht er als solcher den intermediären Kreislauf; und daß er, wenn er erst in die Zirkulation gelangt ist, nicht mehr assimiliert werden kann, sondern quantitativ im Urin ausgeschieden wird, braucht nicht erörtert zu werden. Das haben die Versuche Voits am Erwachsenen und die Kellers am Kinde einwandsfrei dargetan.

Unsere Untersuchungen sind zumeist an Kindern angestellt, die ausschließlich oder vorwiegend Frauenmilch als Nahrung erhielten. Ein Kind (Nr. 11) schied bei Ernährung mit roher Vollmilch Zucker aus. In einem Falle (Nr. 8) war bei Ernährung mit Frauenmilch Laktosurie nachzuweisen, während bei Mehlernährung (Rademanns Mehl) Zucker im Urin nicht auftrat. Allerdings konnte auch hier nicht unerhebliche Reduktion im Urin nachgewiesen werden. Dasselbe Verhalten (starke Reduktion ohne Fähigkeit Osazone zu bilden) konnten wir auch an einer größeren Zahl von Urinen magendarmkranker Säuglinge, die wir in die Tabelle nicht aufgenommen haben, nachweisen. Es müssen

hier Substanzen zur Ausscheidung gelangen, die normaler Weise im Urin nicht vorhanden sind, über deren Natur wir vorläufig nichts Sicheres aussagen können.

Fassen wir unsere Resultate noch einmal kurz zusammen: Bei schwer magendarmkranken Säuglingen wird nur ein Teil des zugeführten Milchzuckers durch Laktase in Dextrose und Galaktose gespalten. Die Spaltungsprodukte werden entweder verbrannt oder eines derselben, die Galaktose, dann, wenn die oxydative Leistungsfähigkeit des Organismus Einbuße erlitten hat, im Harne ausgeschieden. Ein zweiter Teil des Milchzuckers wird ungespalten resorbiert und führt zu einer Laktosurie. Endlich wird ein dritter Teil der Laktose, und zwar wohl die Hauptmasse, der Resorption durch Vergärung im Darme entzogen.

Es erübrigt noch kurz die Bedeutung der Zuckerausscheidung in der Symptomatologie der akuten Ernährungsstörungen zu besprechen. Wenn dieselbe nur darin besteht, daß es sich um einen mehr oder weniger großen Verlust an Zucker, also von kalorischem Wert, durch den Urin handelt, so ist sie nur gering einzuschätzen. Nun ist aber der Einfluß, den die Zuckerausscheidung auf den Gesamtstoffwechsel des Säuglings ausübt, zweifellos ein viel bedenklicherer. Da bei akut magendarmkranken Säuglingen einerseits durch Zersetzungen im Magendarmkanale und Durchfälle, andererseits durch die Appetitlosigkeit und Erbrechen die Aufnahme von Kohlehydraten, bei Frauenmilchernährung von Milchzucker, in den intermediären Stoffwechsel schon an und für sich bedeutend vermindert ist, so ist eine Entziehung von Zucker durch den Urin für den Organismus keineswegs gleichgiltig. Es müssen die Kinder durch alle diese Vorgänge im Verein mit der gleichfalls vorhandenen Inanition in einen Zustand kommen, in dem sie Diabetikern oder künstlich auf Kohlehydratkarenz gesetzten Organismen gleichen. Es bildet sich jene Stoffwechselstörung aus, bei der das Fett einem abnormen Abbau unterliegt, und die durch Ausscheidung von Acetonkörpern und erhebliche Vermehrung der Ammoniakwerte im Urin ausgezeichnet ist. Diese intermediäre Acidose ist nun bei Kindern, die im akuten Stadium ihrer Erkrankung Laktose bzw. Galaktose ausscheiden, tatsächlich vorhanden.

Langstein und Meyer*) konnten neuerdings bei schweren Ernährungsstörungen (akut. Enterokatarrh) neben Ausscheidung

*) Verhandl. d. Gesellsch. f. Kinderheilk. Meran 1901.

von Zucker Vermehrung der renalen Ammoniakausscheidung, auch Acetonurie und Ausscheidung von Oxybuttersäure nachweisen.

Die Art der Störung eröffnet uns vielleicht einen Weg, den wir bei Behandlung der akuten toxischen Magendarmerkrankungen einzuschlagen haben, um wenigstens einen Symptomenkomplex, den der Acidose zu bekämpfen. Wir müssen dafür sorgen, daß die Kinder verbrennbare Kohlehydrate zugeführt erhalten. Da nun die Beibringung derselben durch den Darm auf Schwierigkeiten stößt, insofern, als die Resorption unsicher ist und eventuelle Gärungen den Krankheitszustand ungünstig beeinflussen können, so scheint es uns gerechtfertigt, den Versuch einer subkutanen Einverleibung von Dextrose oder Maltose zu wagen. Ersterer Zucker scheint ebenso wie letzterer, der intermediär durch Maltase, die (nach Untersuchungen des einen von uns) auch bei den schwerstkranken Kindern vorhanden ist, in zwei Moleküle Dextrose zerlegt wird, auch in ungünstigen Fällen assimilierbar zu sein. Ob aber durch diese Therapie die Acidose bekämpft werden kann und ob eine eventuelle Herabsetzung derselben den Allgemeinzustand günstig beeinflußt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

XXXVII.

Zur Kenntnis der Eiweißpeptone.

Von **L. B. Stookey** (Los Angeles, Cal.)

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Mittels fraktionierter Sättigung mit Ammonsulfat hat E. P. Pick*) im hiesigen Laboratorium das Gemenge der Albumosen, wie es bei der Pepsinverdauung des Fibrins erhalten wird, in unter sich verschiedene Fraktionen getrennt; er hat ferner gezeigt, daß das Ammonsulfatverfahren auch zur Untersuchung der nicht mehr aussalzbaren Verdauungsprodukte verwendbar ist. Aus der mit Ammonsulfat gesättigten Lösung konnte er nämlich, vorausgesetzt, daß die Salzsättigung erhalten blieb, weitere Verdauungsprodukte ausfällen, so durch Mineralsäuren die „Albumose C", die ihren Reaktionen nach jedenfalls weit vom Eiweiß abstand, und ferner durch Jod ein Gemenge von „Peptonen", das dann durch Alkohol weiter getrennt werden konnte.

In ähnlicher Weise haben bald darauf Siegfried**) und seine Schüler die Fällung mit Eisenammoniakalaun in ammonsulfatgesättigter Lösung zur Abscheidung der durch Trypsin- und Pepsinverdauung aus Eiweiß und Leim erhältlichen Peptone benutzt.

Es war weiter im hiesigen Laboratorium festgestellt worden, daß das Verfahren der Peptonfällung aus salzgesättigter Lösung bei Verwendung geeigneter Fällungsmittel einer weiteren Ausbildung fähig sei; ich habe nun einer Aufforderung von Herrn Prof. Hofmeister folgend eine Durcharbeitung der bei Pepsin-

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **24**, 246. — Diese Beiträge **2**, 481.

) Zeitschr. f. physiol. Chemie **27, 335 und **35**, 164.

verdauung von Blutalbumin erhaltenen Peptone nach diesem Verfahren in Angriff genommen und die so erhaltenen Fraktionen, die immer noch Gemenge darstellen, durch Darstellung von Benzoyl-, Benzosulfo- und Naphthalinsulfoprodukten weiter in ihre Bestandteile aufzulösen versucht.

Aus äußeren Gründen mußte die Untersuchung abgebrochen werden, ehe es gelungen war, die einzelnen Produkte mit der wünschenswerten Schärfe zu charakterisieren. Bei der großen Wichtigkeit, die der Aufklärung der zwischen dem nativen Eiweiß und den Endprodukten stehenden Zwischenglieder zukommt, dürften die erhaltenen Produkte, wenngleich sie nur zum Teil durch scharfen Schmelzpunkt und durch Reaktionen als annähernd homogen charakterisiert sind, immerhin Beachtung verdienen. Jedenfalls zeigen sie, daß der eingeschlagene Weg eine weitere Bearbeitung des schwierigen Peptongebiets ermöglicht. Die nachstehende kurze Mitteilung soll dem hiesigen Laboratorium die ungestörte Weiterverfolgung dieses Weges sichern.

Pepsinverdauung von 14tägiger Dauer.

40 Liter Blutserum wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 0,8 Proz. H_2SO angesäuert und nach Zufügung der zerkleinerten Schleimhaut von 5 Schweinemägen 14 Tage verdauen gelassen. Dann wurde mit Ammoniak neutralisiert, die Flüssigkeit auf 20 Liter eingeengt und mit festem Ammonsulfat gesättigt. Die klar filtrierte mit dem gleichen Salz gesättigte Flüssigkeit wurde nacheinander mit salzgesättigten Lösungen von Kupfersulfat, Eisenammoniakalaun und Jodquecksilberkalium gefällt, worauf das Filtrat keine Biuretreaktion mehr darbot. Die ersten beiden Niederschläge wurden durch mehrfach wiederholtes Lösen in Wasser und neuerliches Sättigen mit Ammonsulfat von anhaftenden Beimengungen befreit, dann wurden die Metalle als Sulfide entfernt Durch Schütteln mit Benzosulfochlorid konnte aus der Kupferfraktion das unten beschriebene Benzosulfoderivat, aus der Eisenfraktion mit Benzoylchlorid ein Benzoylprodukt abgeschieden werden.

Der Jodquecksilberkaliumniederschlag erwies sich als in Wasser unlöslich. Er wurde mit Wasser ausgewaschen und durch Behandeln mit etwa 5 proz. Ammoniumkarbonatlösung in eine darin lösliche Fraktion und einen Rückstand getrennt, der erst bei Anwendung einer nahezu gesättigten Lösung von Ammoniumkarbonat gelöst wurde. Aus dem leichter löslichen Teil konnten nach Entfernung des Quecksilbers und Jods durch aufeinander folgendes Schütteln in alkalischer Lösung erst mit Naphthalinsulfochlorid, dann mit Benzoylchlorid ziemlich gut charakterisierte Produkte erhalten werden. Im Filtrat war nur eine schwache Biuretreaktion nachweisbar. Ebenso wurde aus der in Ammoniumkarbonat schwer löslichen Fraktion zunächst ein Benzoylprodukt, dann ein Benzoylsulfoprodukt, und im Filtrat davon nach weitgehendem Einengen neuerlich

ein Benzoylprodukt erhalten. Das Filtrat zeigte dann keine Biuretreaktion mehr.

Es gelingt sonach unter Umständen nahezu sämtliche die Biuretreaktion darbietenden Peptide („Peptone") aus der die Endprodukte enthaltenden Verdauungslösung auszufällen und so einer gesonderten chemischen Untersuchung zuzuführen.

In betreff der einzelnen Produkte sei nachstehendes vorläufig mitgeteilt. Die Besprechung ihrer Beziehung zu bereits beschriebenen „Peptonen" soll weiteren Mitteilungen vorbehalten bleiben.

I. Das Benzosulfoprodukt der Kupfersulfatfraktion

wurde mit Wasser ausgewaschen, getrocknet und durch wiederholte Fällung mit Aceton aus absolut-alkoholischer Lösung gereinigt. Die Substanz roch beim Erhitzen auf dem Platinblech nach verbrennendem Leim, begann bei 164° zu sintern, schmolz aber endgültig erst bei 194°. Sie löste sich in konzentrierter Salzsäure und fiel daraus auf Wasserzusatz wieder aus. Zusammensetzung und Reaktionen sind aus der am Schluß beigefügten Tabelle ersichtlich.

Beim Kochen von 5 g des Produktes mit 25proz. Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Biuretreaktion blieb ein Rückstand von etwa einem Gramm, der in Alkohol löslich war und Molischs Reaktion sehr ausgesprochen gab. Der Zersetzungsflüssigkeit fehlte diese Reaktion nahezu ganz. Hingegen konnte aus ihr Asparaginsäure (als Kupfersalz), Tyrosin (in kleiner Menge) und eine durch Pikrinsäure fällbare Base (vermutlich Lysin) erhalten werden. Obgleich sicher noch Aminosäuren vorhanden waren — die übrigbleibende stickstoffreiche Substanz löste reichlich Kupferkarbonat mit schön blauer Farbe —, so konnten sie bei der zur Verfügung stehenden geringen Menge nicht weiter identifiziert werden.

Der nicht befriedigende Schmelzpunkt und das Vorhandensein fast aller dem Eiweiß zukommenden konstitutionellen Reaktionen lassen die Einheitlichkeit des erhaltenen Produkts zunächst noch zweifelhaft erscheinen.

II. Das Benzoylprodukt aus der Eisenammoniakalaunfraktion.

Es wurde durch Waschen mit Wasser, Überführen in absoluten Alkohol und Fällung mit Petroläther gereinigt. Da die Ausbeute sehr gering war, mußte auf weitere Reinigung und Analyse verzichtet werden. Die Reaktionen der Substanz sind in der Tabelle angeführt.

III. Das Naphthalinsulfoprodukt aus der in Ammoniumkarbonat leicht löslichen Fraktion des Jodquecksilberniederschlags

wurde durch Lösen in Natronlauge und Fällen mit Essigsäure gereinigt. Die trockene Substanz schmolz bei 152°, verbreitete beim Verbrennen Horngeruch; Zusammensetzung und Reaktionen sind aus der Tabelle ersichtlich. Die Substanz gab außer der Biuretreaktion und einer schwachen Xanthoproteinprobe keine der konstitutionellen Eiweißreaktionen, muß daher als ein relativ einfaches Bruchstück der Eiweißmoleküls aufgefaßt werden.

IV. Das Benzoylprodukt aus der in Ammoniumkarbonat leicht löslichen Fraktion des Jodquecksilberniederschlags

wurde nach Auswaschen mit Wasser getrocknet, dann einigemal in absolutem Alkohol gelöst und daraus mit Petroläther gefällt. Die Substanz sinterte bei 170° und schmolz bei 185°. Analyse und Reaktionen sind in der Tabelle angegeben.

V. Das erste Benzoylprodukt aus der in Ammoniumkarbonat schwer löslichen Fraktion des Jodquecksilberniederschlags.

Das Produkt wurde mit Wasser ausgewaschen und durch wiederholtes Lösen in absolutem Alkohol und Fällen mit Petroläther gereinigt. Die erhaltene weiße aschefreie Substanz verbrannte mit Horngeruch, begann bei 145° zu sintern, schmolz aber erst gegen 200°. Sie besaß eine dem Produkt IV sehr ähnliche Zusammensetzung und gab die in der Tabelle angegebenen Reaktionen.

VI. Das Benzosulfoprodukt aus der in Ammoniumkarbonat schwer löslichen Fraktion des Jodquecksilberniederschlags

wurde nach Waschen mit Wasser und Trocknen durch Lösen in absolutem Alkohol und Fällen mit Petroläther gereinigt. Es begann bei 164° zu sintern, war aber erst bei 194° geschmolzen. Beim Verbrennen trat Horngeruch auf. Die Analysenergebnisse — zur Schwefelbestimmung reichte die Menge nicht — und die Reaktionen sind in der Tabelle angeführt.

VII. Das zweite Benzoylprodukt aus der in Ammoniumkarbonat schwer löslichen Fraktion des Jodquecksilberniederschlags

war durch sehr starke Reaktion nach Molisch ausgezeichnet. Es wurde in ähnlicher Weise wie die vorhergehenden Produkte gereinigt und so als ein weißes Pulver von scharfem Schmelzpunkt (165°) erhalten. Zusammensetzung und Reaktionen siehe Tabelle.

2 Gramm werden mit 5proz. siedender Schwefelsäure gespalten. Es blieb ein kleiner Rückstand, der die starke Kohlehydratreaktion der Muttersubstanz zeigte. Die Zersetzungsflüssigkeit gab mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag, aus dem ein basischer, durch Pikrinsäure fällbarer Körper erhalten werden konnte. Im Filtrat konnten weder Tyrosin noch Glutamin- oder Asparaginsäure nachgewiesen werden, obgleich Aminosäuren sicher vorhanden waren.

Pepsinverdauung von 8wöchentlicher Dauer.

Die große Mannigfaltigkeit von Zwischenprodukten, die bei 14tägiger Verdauung erhalten worden waren, veranlaßten mich, einen analogen Versuch von zweimonatlicher Dauer anzustellen, um zu sehen, ob dann dieselben oder aber andere Peptonfraktionen erhalten würden. Die Flüssigkeit enthielt beim Abbrechen des Versuches noch primäre und sekundäre Albumosen, sowie den aus salzgesättigter Lösung durch Kupfersulfat und durch Eisenammonalaun fällbaren Körper, ohne daß eine deutliche quantitative Verschiedenheit gegen den vorigen Versuch ersichtlich gewesen wäre. Hingegen ergab sich eine Abweichung darin, daß es nicht gelang, die die Biuretreaktion darbietenden Stoffe durch Jodquecksilberkalium völlig auszufällen. Während ferner im vorigen Versuch die Menge des in Ammoniumkarbonat leicht und des darin schwer löslichen Anteils des Jodquecksilberniederschlags annähernd gleich war, ergab sich hier nur eine geringe Menge der schwer löslichen Fraktion.

Pankreasverdauung.

Bei einem mit Pankreas angestellten Vergleichsversuch, der bis nahe zum Verschwinden der Biuretreaktion fortgeführt wurde, ergab sich in der mit Ammonsulfat gesättigten Flüssigkeit nur geringe Fällung mit Kupfersulfat, ebenso mit Eisenammoniakalaun und Jodquecksilberjodkalium. Auch in diesem Falle war es nicht möglich, mit letztgenanntem Reagens die die Biuretreaktion gebenden Stoffe gänzlich auszufällen.

Tabelle.

		Zusammensetzung in Proz.					Reaktionen					
		C	H	N	S	O	Schwefelbleiprobe	Millons Probe	Xanthoproteinprobe	Hopkins' Probe	Molischs Probe	Biuretprobe
I	Benzosulfoprodukt aus der Kupferfraktion	49,21	6,49	10,22	7,83	26,25	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
II	Benzoylprodukt aus der Eisenfraktion	·	·	·	·	·	pos.	pos	pos.	pos.	pos.	pos.
III	Naphthalinsulfoprod. a. d. in 5 proz. Ammoniumkarbonat lösl. Fraktion des Jodquecksilberniederschl.	56,82	5,49	8,19	12,01	17,49	neg.	neg.	schwach	neg.	neg.	pos.
IV	Benzoylprodukt aus derselben Fraktion	58,23	6,63	12,11	·	23,03	neg.	neg.	pos.	schwach	neg.	pos.
V	Erst. Benzoylprod. a. der in konz. Amm.-Karb. lösl. Fraktion d. Jodquecks.-Ndrschl	57,65	6,51	12,39	·	23,45	neg.	neg.	schwach	neg.	neg.	pos.
VI	Benzosulfoprodukt aus derselben Fraktion	51,53	7,00	12,00	·	·	neg.	neg.	schwach	neg.	neg.	pos.
VII	Zweites Benzoylprodukt aus derselben Fraktion	58,68	5,88	8,96	·	26,48	neg.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.

Verzeichnis der Mitarbeiter des 7. Bandes.

Buchdruckerei A. W. Zickfeldt, Osterwieck/Harz.

W. ZICKFELDT, OSTERWIECK HARZ

